



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VLIV KOVOVÝCH IONTŮ NA TOKOVÉ CHOVÁNÍ ROZTOKŮ POLYELEKTROLYTŮ

EFFECT OF METAL IONS ON THE RHEOLOGICAL BEHAVIOUR OF POLYELECTROLYTE  
SOLUTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA LIŠKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. JIŘÍ JANEČEK, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0388/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Bc. Kateřina Lišková</b>	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	<b>RNDr. Jiří Janeček, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Martin Chytil, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Vliv kovových iontů na tokové chování roztoků polyelektrolytů

### Zadání diplomové práce:

1. Provedení reologických experimentů na roztocích CMC s proměnným poměrem vápenatých a sodných iontů
2. Molekulární simulace fragmetu polyelektrolytu v přítomnosti jedno- a dvojmocných iontů.
3. Interpretace výsledků.

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Kateřina Lišková  
Student(ka)

-----  
RNDr. Jiří Janeček, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce je rozdělena na dvě části. První se zabývá studiem reologického chování roztoků sodné soli karboxymethylcelulózy (CMC-Na) v přítomnosti sodných a vápenatých iontů. Roztoky CMC-Na o různých koncentracích byly připraveny rozpouštěním ve vodných roztocích NaCl nebo CaCl<sub>2</sub>. Byl studován vliv jednomocných a dvojmocných iontů na zdánlivou viskozitu roztoku a viskoelastické vlastnosti. Bylo zjištěno, že vlivem vápenatých iontů při nízkých koncentracích CMC-Na (do 0,5% hm.) dochází k nárůstu elastického charakteru roztoků, přičemž tuhost vzorku roste s koncentrací vápenatých iontů. Tento nárůst by mohl indikovat tvorbu gelové sítě, na druhou stranu viskozita těchto roztoků se snižovala s koncentrací vápenatých iontů. V případě roztoků o koncentracích vyšších než 1,5% hm. nebyly pozorovány změny viskozity vlivem přidaných iontů. Reologické chování bylo porovnáno také s roztoky bez přídavku elektrolytu a s roztoky kyselé formy karboxymethylcelulózy (CMC-H).

Ve druhé části byly provedeny molekulárně dynamické simulace tetrameru hyaluronanu sodného a vápenatého ve vodném prostředí. Byla studována struktura a uspořádání molekul vody v okolí hyaluronanového řetězce. Struktura byla popisována pomocí formalismu radiálních distribučních funkcí. Získané výsledky v případě systému obsahující pouze sodné ionty jsou v souladu s dříve publikovanými údaji. Přítomnost vápenatých iontů nezpůsobuje kvalitativní změnu v průběhu radiálních distribučních funkcí oproti systému se sodnými ionty.

## KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, karboxymethylcelulóza sodná, elektrostatické interakce, viskoelastická, molekulová dynamika

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is focused on two parts. The first one deals with rheological behavior of sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) solutions in the presence of sodium and calcium ions. The solutions of various concentrations were prepared by solubilization in aqueous solutions of NaCl or CaCl<sub>2</sub>. The effect of monovalent and bivalent ions on apparent viscosity and viscoelastic properties of these solutions was studied. It was found that in the case of low concentrations of CMC-Na in the sample (up to 0.5% w/w) the elastic character increases. At the same time the stiffness of the sample is higher with higher concentration of calcium ion in the solution. This increase might indicate the formation of gel network. On the other hand the viscosity of these solutions decreases with higher concentration of calcium ions. In case of solutions with concentration higher than 1.5% w/w changes of viscosity did not happen by influence of addition ions. Rheological behavior was compared also with solutions prepared without adding an electrolyte as well as with acid form of carboxymethylcellulose (CMC-H).

In terms of second part the molecular dynamic simulations of hyaluronan tetramer both sodium and calcium in aqueous medium were performed. Structure and arrangement of water molecules in the surrounding of hyaluronan chain were studied. Structure was described by formalism of radial distribution functions. In the case of system containing sodium ions only, the obtained results are in accordance with earlier published data. Presence of calcium ions does not cause qualitative changes during the radial distribution functions in comparison with the system with sodium ions.

## **KEYWORDS**

hyaluronan, sodium carboxymethylcellulose, electrostatic interactions, viscoelasticity, molecular dynamic



LIŠKOVÁ, K. *Vliv kovových iontů na tokové chování roztoků polyelektrolytů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 75 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jiří Janeček, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Touto cestou bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Janečkovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné náměty a všestrannou pomoc při jejím vypracování. Mé díky patří také Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za pomoc a konzultace v oblasti reologického měření.*

*Nutno také poděkovat kolektivu laborantek laboratoře fyzikální chemie za laskavý přístup a zapůjčení potřebného technického vybavení a všem těm, kteří mi věnovali svůj čas.*

*Zvláště děkuji i svým rodičům za podporu nejen při studiu, ale i v životě...*

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
2.1 Kyselina hyaluronová	9
2.1.1 Výskyt	9
2.1.2 Výroba	9
2.1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti	9
2.1.4 Funkce	10
2.1.5 Využití	11
2.2 Karboxymethylcelulóza sodná	12
2.2.1 Výskyt	12
2.2.2 Výroba	12
2.2.3 Vlastnosti	12
2.2.4 Využití	13
2.2.5 Konformace	13
2.3 Roztoky lineárních polyelektrolytů a jejich viskozita	14
2.3.1 Současný stav problematiky	15
2.4 Reologie	16
2.4.1 Newtonské kapaliny	16
2.4.2 Nenewtonské kapaliny	18
2.4.2.1 Časově nezávislé nenewtonské kapaliny	18
2.4.2.2 Časově závislé nenewtonské kapaliny	19
2.4.3 Gely	19
2.4.3.1 Gelatinizace roztoků vysokomolekulárních látek	20
2.5 Viskozimetrie	20
2.5.1 Viskozita roztoků makromolekulárních látek	20
2.5.2 Měření viskozity	21
2.5.2.1 Kapilární viskozimetry	21
2.5.2.2 Viskozimetry s padající koulí	21
2.5.2.3 Rotační viskozimetry	22
2.5.3 Reologické testy	23
2.5.3.1 Rampový test napětí („ramp test“)	23
2.5.3.2 Ustálený tok („steady state“)	23
2.5.3.3 Amplitudový test („strain sweep test“)	23
2.5.3.4 Frekvenční test („frequency sweep test“)	24
2.5.4 Síťování polymerů	26
2.6 Počítačové simulace	28
2.6.1 Molekulová dynamika	28
2.6.2 Molekulární modelování hyaluronanu ve vodném prostředí	30
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>32</b>
3.1 Reologie	32
3.1.1 Použité chemikálie a přístroje	32
3.1.1.1 Chemikálie	32
3.1.1.2 Přístroje a pomůcky	32
3.1.1.3 Použitý software	32

3.1.2	Metody .....	32
3.1.2.1	Sodná sůl karboxymethylcelulózy v prostředí elektrolytů.....	33
3.1.2.2	Protonizovaná forma karboxymethylcelulózy .....	34
3.1.3	Měření reologických vlastností .....	34
3.1.4	Měření hodnot pH.....	35
3.1.5	Statistické vyhodnocení dat .....	35
3.2	Počítačové simulace .....	36
3.2.1	Software .....	36
3.2.2	Molekulové modelování .....	36
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
4.1	Reologie .....	40
4.1.1	Sodná sůl karboxymethylcelulózy (CMC-Na) .....	40
4.1.1.1	CMC-Na s přídavkem NaCl ( $I = 0,1M$ ) .....	44
4.1.1.2	CMC-Na s přídavkem $CaCl_2$ ( $I = 0,1M$ ) .....	46
4.1.2	Protonizovaná forma (CMC-H) původní soli .....	50
4.1.3	Srovnání stejných koncentrací CMC-Na s přídavky elektrolytů a CMC-H .....	51
4.1.4	CMC-Na v různě koncentrovaných roztocích $CaCl_2$ .....	56
4.1.4.1	0,5% hm. CMC-Na v různě koncentrovaných roztocích $CaCl_2$ .....	56
4.1.4.2	1% hm. CMC-Na s různě koncentrovaným prostředím $CaCl_2$ .....	59
4.1.5	Měření pH .....	62
4.2	Počítačové simulace .....	63
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>74</b>

# 1 ÚVOD

Polyelektrolyty představují významnou skupinu polymerů. Jedná se o látky, které ve vodných roztocích disociují, čímž vzniká makromolekulární řetězec nesoucí kladný nebo záporný náboj. Mezi polyelektrolyty patří řada významných syntetických materiálů (např. polyakrylová kyselina, polystyren sulfonáty), přírodních polymerů (např. proteiny, nukleové kyseliny a deriváty polysacharidů) a materiály polosyntetického původu (např. deriváty celulózy a chitosan). Díky svému iontovému charakteru mají polyelektrolyty vysokou afinitu k vodě a představují tedy významné zástupce hydrofilních polymerů. Pro své vlastnosti a biokompatibilitu nachází řada zejména přírodních a polosyntetických polyelektrolytů uplatnění v lékařství a farmakologii. Jedním z nejvýznamnějších zástupců je kyselina hyaluronová (HA), která je hojně zastoupena v tkáních obratlovců, kde funguje jako zadržovač vody (oční sklivec, synoviální tekutina, kůže).

Jednou z možných aplikací některých polyelektrolytů, zejm. HA a jejích derivátů, představují systémy pro řízené uvolňování léčiv (perorální tablety, přípravky pro intravenózní podání). Ve srovnání s běžnými formami přinášejí celou řadu výhod. Mezi nejdůležitější patří optimální přívod léčivé látky do organismu požadovanou rychlostí a v určeném časovém intervalu a cílený transport. Zabudováním léčiva do vhodné lékové formy dochází k prodlouženému uvolňování a účinku. Mezi nejjednodušší lékovou formu se řadí matricový typ tablety, který je tvořen léčivem rovnoměrně rozptýleným v hydrofilním polymeru. Ten při styku s vodou bobtná a na povrchu vytváří gelovou vrstvu řídící uvolňování léčiva z matrice. Léčivá látka se z matrice uvolňuje na základě eroze gelové vrstvy, která je charakteristická pro látky těžce rozpustné ve vodě. Vlastnosti tablet závisí na vlastnostech polymerního nosiče a léčivé látky, jež mohou být částečně upraveny dalšími aditivy.

Kyselina hyaluronová nachází další uplatnění v očním lékařství, zejména díky svým viskoelastickým vlastnostem. Jednak je využívána při očních chirurgických operacích a také je důležitou složkou některých léčiv ve formě očních kapek. Jednou z funkcí HA v očních přípravcích je zvýšení viskozity roztoků, což zabraňuje rychlému vytékání a umožňuje tak delší působení léčiva.

Tokové vlastnosti roztoků polymerů lze ovlivnit molekulovou hmotností a koncentrací. V případě polyelektrolytů hraje roli i iontová síla prostředí a ionty přítomné v roztoku. V této práci byla sledována možnost ovlivnění viskoelastických vlastností roztoků sodné soli karboxymethylcelulózy (CMC-Na) přítomností sodných a vápenatých iontů. Přestože prvotním důvodem pro studium těchto jevů na CMC-Na byla nižší cena této látky v porovnání s HA, ukázalo se, že přímo i CMC-Na nachází uplatnění jako substitut pro slzy, je-li narušena přirozená produkce těchto tekutin.

Dvojmocné ionty v roztoku mohou ovlivňovat také strukturu hydratačního obalu v okolí jednotlivých skupin na řetězci HA. Ke studiu tohoto ovlivnění byly použity molekulárně dynamické simulace.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kyselina hyaluronová

#### 2.1.1 Výskyt

Kyselina hyaluronová je přirozenou součástí lidského těla. Je přítomná ve většině tkání obratlovců ve formě vodného roztoku. Společně s kolagenem, elastinem a proteoglykany je součástí mezibuněčné hmoty, která obklopuje migrující a proliferující buňky, zvláště v embryonálních tkáních [1].

Je hlavní součástí synoviální tekutiny v mezibuněčné hmotě chrupavky. Ve vysoké koncentraci je také přítomna ve sklivci lidského oka, v kůži (v základní substanci koria) i v pupeční šňůře. Mimo lidské tělo je její koncentrace zvláště vysoká v kohoutích hřebíncích [2, 3].

#### 2.1.2 Výroba

Prvním známým způsobem izolace a čištění kyseliny hyaluronové, používaným pro farmaceutické účely, je metoda vyvinutá Balazsem. Výchozí tkání byly právě kohoutí hřebínky nebo pupeční šňůra [4]. Ze všech jejích přírodních zdrojů byla samotná extrakce obtížná, drahá a produkt obsahoval mnoho příměsí (např. proteiny, chondroitin sulfát), což vedlo k přenosu virových onemocnění a alergickým reakcím [2].

Z praktického hlediska, hlavně pro aplikace v kosmetickém průmyslu, je zajímavé získávání kyseliny hyaluronové pomocí fermentace bakteriemi *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, které ji obsahují v jejich kapsule [4]. Tyto bakterie mohou za pomoci kontrolovaných kultivačních podmínek vyprodukovat kyselinu hyaluronovou s vysokým stupněm čistoty [2].

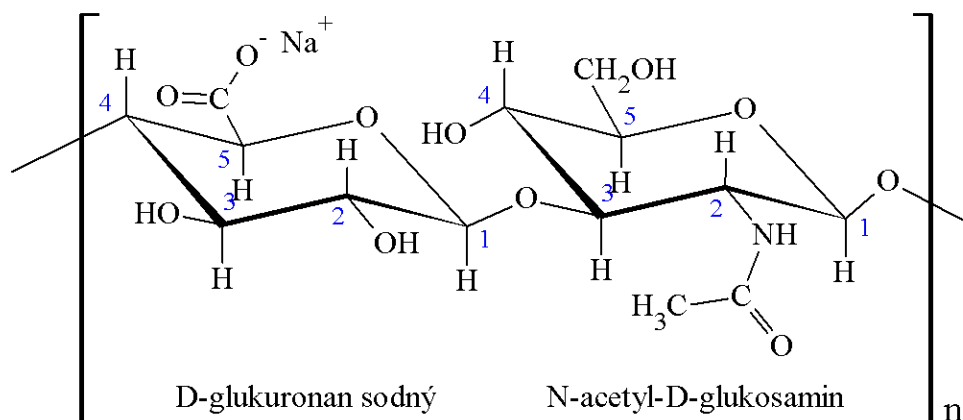
Tento biopolymer doposud nebyl syntetizován in vitro [1]. Současné extrakční technologie poskytují velká množství HA za relativně nízkou cenu, což usnadňuje její další výzkum a rozšiřuje paletu možných aplikací [5]. Předním světovým výrobcem vysoce kvalitní kyseliny hyaluronové je firma CPN s.r.o. nacházející se v Dolní Dobrouči. Výrobky holdingu Contipro Group jsou určené pro farmaceutický průmysl a také pro využití v kosmetice a výživě [6].

#### 2.1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti

Kyselina hyaluronová patří mezi přírodní deriváty polysacharidů a řadí se do skupiny glykosaminoglykanů. Struktura HA je odvozena od derivátů glukózy. Jedná se o biopolymer, jehož primární struktura se skládá z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě spojeny  $\beta(1\rightarrow3)$  a  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami. Struktura jednotky je znázorněna na Obr. 1. Výsledkem je velmi dlouhý lineární řetězec molekul, který může dosahovat molekulové hmotnosti 400–500 kDa [7].

Vzhledem k tomu, že obsahuje zbytky kyseliny glukuronové a prakticky nikdy se nenachází ve fyziologickém prostředí jako samotná kyselina, může pevně vázat kationty, jako např.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  za vytvoření soli. Z toho důvodu se začal od roku 1996 užívat název hyaluronan, jež je připisován Balazsovi [2].

Disociované karboxylové skupiny na glukuronových jednotkách způsobují vysokou afinitu k vodě, v níž dochází k bobtnání. Záporný náboj těchto skupin má za následek vzrůst perzistenční délky, což způsobuje, že vodné roztoky hyaluronanu jsou vysoce viskózní.



**Obr. 1** Strukturní jednotka hyaluronanu sodného obsahující glykosidické vazby  $\beta(1\rightarrow3)$  a  $\beta(1\rightarrow4)$

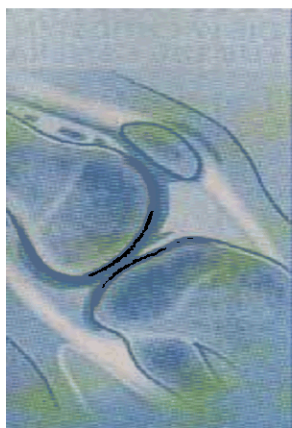
Další důležitou vlastností charakterizující makromolekulární řetězec je disociační konstanta (resp. její záporný logaritmus, pK). Obecně hodnota pK určité skupiny na řetězci polyelektrolytu závisí na disociačním stupni ostatních funkčních skupin přítomných v molekule. Hodnota pK kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích se pohybuje od 3,45 (v čisté vodě) do 2,95 (v 0,2M NaCl) v závislosti na koncentraci elektrolytu [4].

Charakteristickou vlastností roztoku hyaluronanu je jeho viskoelastická, která hraje důležitou roli v biologických funkcích v organismech. Tato vlastnost částečně vyplývá ze schopnosti vázat molekuly vody prostřednictvím vodíkové vazby a zadržovat ji v pokožce. HA je schopna vázat množství vody, které mnohonásobně převyšuje její vlastní hmotnost. V důsledku částečně hydrofilních a částečně hydrofobních vlastností utváří HA ve vodných roztocích náhodně spirálovitou konfiguraci [4].

#### 2.1.4 Funkce

V organismech plní hyaluronan řadu důležitých fyziologických funkcí jako udržování struktury tkání, jejich lubrikaci a ochranu. Struktura molekuly kyseliny hyaluronové způsobuje její schopnost vázat mnoho molekul vody za tvorby velmi viskózního gelu. Ten pojivovým tkáním přináší schopnost odolávat vnějšímu tlaku (Obr. 2). Výměna živin mezi buňkami a obsah vody ve tkáních je kyselinou hyaluronovou regulován. Vyplňuje prostor mezi buňkami, kterým tak umožňuje vytvářet prostor k jejich dělení a metabolickým funkcím. Má tedy důležitou funkci v agregaci a mobilizaci buněk. HA zásadně ovlivňuje fyziologii kůže, její strukturální funkci a obnovu [2].

Má také vliv na difúzi jiných makromolekulárních látek, čímž se regulují transportní děje v tkáních [4].



Stárnutím organismus produkuje kyselinu hyaluronovou čím dál méně, z toho důvodu klouby ztrácejí svoji přirozenou lubrikaci. Bylo prokázáno, že u osteoartrózy koncentrace a molekulová hmotnost HA klesají. Po tomto zjištění byla formulována představa, že zevní aplikací kyseliny hyaluronové dojde k normalizaci vlastností synoviální tekutiny [5].

**Obr. 2** *Pojivové tkáně v kloubním spojení*

### 2.1.5 Využití

Existuje několik preparátů na bázi kyseliny hyaluronové o různé molekulové hmotnosti. Některé z nich ovšem nejsou vhodné pro aplikaci v medicíně, protože obsahují velké množství bílkovin, které by mohly vyvolat zánětlivé onemocnění.

V současné době zájem o výzkum kyseliny hyaluronové stále více narůstá i v důsledku jejích terapeutických účinků. Tato kyselina a její soli tvoří základní složku látek používaných v oční medicíně, v tzv. viskochirurgii. Používá se při extrakci kataraktu (šedého zákalu), operacích glaukomu (zeleného zákalu), implantaci očních čoček i keratoplastice (transplantaci rohovky) [4].

V nízkých koncentracích se jednotlivé hyaluronové řetězce zaplétají a tvoří souvislé sítě, které způsobují, že se tyto roztoky jeví jako ideální pro oční přípravky. Nevýhodou obyčejných vodných roztoků očních kapek je fakt, že více jak 75 % použitého roztoku oteče během prvních dvou minut po aplikaci. Proto jsou tedy přidávány polymery zvyšující viskozitu roztoků a zlepšující oční prostředí a následně také vedoucí k lepší biologické dostupnosti samotných léků. Oční přípravky obsahující HA poskytují dlouhotrvající ochranu rohovky a přispívají také k jejímu hojení. Uplatnění našly jako umělé slzy používané při vysychání očí [8].

Pracovníci výzkumného týmu Ludwig a kol. srovnávali roztoky kyseliny hyaluronové se stejně viskózními roztoky hydroxyethylcelulózy a zjistili, že oba druhy polymerů výrazně zvyšují zádrž fluoresceinu v slzné vrstvě. Nicméně roztoky HA byly mnohem lépe snášeny, což je připisováno jejich výrazně lepším pseudoplastickým vlastnostem. Obecně totiž platí, že viskozita roztoků HA výrazně klesá při vysokých smykových rychlostech. Ty nastávají během mrkání a tím se snižuje podrážděnost [9].

Díky jedinečným hydratačním, elastickým a dalším vlastnostem se používá jako přísada do opalovacích krémů či prostředků proti vráskám [10].

Perspektivní je využití síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové, tzv. hylanů při výrobě různých typů implantátů používaných v chirurgii a roztoků aplikovaných při léčbě kloubních onemocnění. Velmi zajímavé je její využití při ovrstvování různých výrobků z gumy, PVC, polytetrafluorethylenu využívaných např. v kardiochirurgii a při výrobě kontaktních čoček [4, 5].

## 2.2 Karboxymethylcelulóza sodná

### 2.2.1 Výskyt

Sodná sůl karboxymethylcelulózy (CMC-Na) je derivát celulózy, který se v přírodě volně nevyskytuje. Zato celulóza je nejrozšířenějším biopolymerem na zemském povrchu. Tvoří hlavní stavební látku rostlinných primárních buněčných stěn. Spolu s ligninem se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn. Mimo to se však celulóza vyskytuje i u některých živočichů např. u pláštěnců [11]. Ročně vznikne až 1,5 mil. tun tohoto biopolymeru [12].

### 2.2.2 Výroba

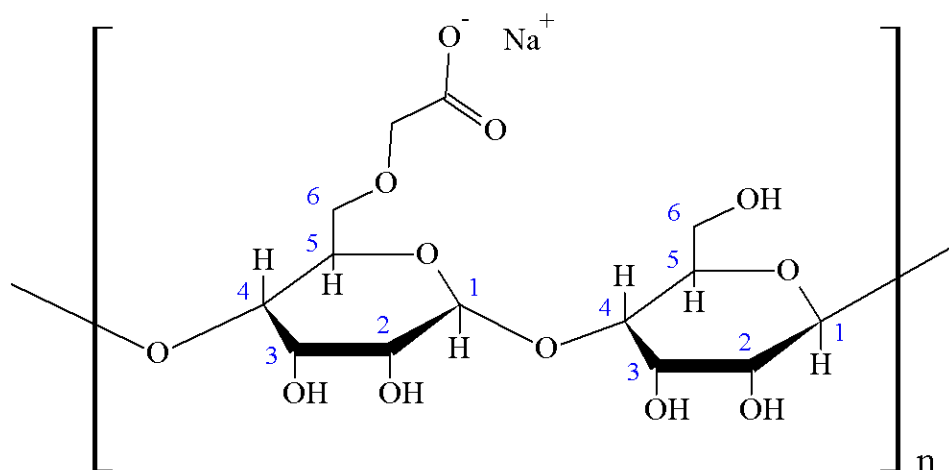
CMC-Na byla vyrobena během první světové války a její masová produkce začala v Německu ve třicátých letech. Od roku 1947 se vyráběla i v USA. Výroba CMC-Na v bývalém Československu započala v šedesátých letech minulého století v Lovosicích [13].

Jako výchozí surovina při výrobě CMC-Na se používá celulóza, která je získávána z rostlinných materiálů [14]. Reakcí celulózy s kyselinou chloroctovou v alkalickém prostředí (NaOH) potom vzniká CMC-Na.

Jedna výrobní verze vychází z přípravy monochloracetátu sodného ze sody a kyseliny monochloroctové. Druhá a zároveň lepší varianta spočívá nejprve v přidavku alkalické celulózy k sodě v reaktoru a poté následným přidáním krystalické kyseliny chloroctové. Tímto je možné udržet reakční teplotu na zhruba 33 °C. Při nižších teplotách probíhá reakce pomalu či vůbec, při vyšších se tvoří nefunkční a mírně toxický glykolát [13].

### 2.2.3 Vlastnosti

Molekula CMC-Na se skládá z jednotek  $\beta$ -glukopyranózy, které jsou vzájemně spojeny vazbou  $\beta(1\rightarrow4)$  do lineárního polymerního řetězce. Karboxymethylové skupiny mohou být navázány k hydroxylovým skupinám na uhlících číslo 2, 3 a 6 (Obr. 3), přičemž žádná z těchto poloh není výrazně preferována.



**Obr. 3** Karboxymethylcelulóza sodná

Molekuly CMC-Na jsou obecně kratší než původní řetězce celulózy, což je důsledek derivatizace a tvorby míst s vyšší a nižší substitucí [15]. Teoretický maximální stupeň



substituce ( $DS = 3$ ) není možné dosáhnout, průměrné hodnoty  $DS$  bývají v rozmezí 0,4–1,5 [16].

Čištěná CMC-Na je bílý až nažedlý, netoxický, biologicky odbouratelný prášek bez zápachu, který lze rozpustit v teplé nebo studené vodě. Obecně platí, že nižší stupeň substituce CMC-Na má za následek rozpustnost ve vodných nebo alkalických roztocích, střední  $DS$  ve studené vodě a vysoký  $DS$  znamená větší rozpustnost v organických rozpouštědlech [15, 16].

#### 2.2.4 Využití

CMC-Na je používána jako vysoce účinná přísada ke zlepšení vlastností produktů např. potravin, kosmetiky a léků, ale také výrobků papírenského a textilního průmyslu. V potravinářském průmyslu slouží CMC-Na především jako zahušťovadlo (pomazánky), stabilizátor emulzí (omáčky, polévky, dresingy), solubilizátor některých proteinů (želatina, kasein) a také retardér tvorby krystalů (zmrzlina) [16].

Dále je CMC-Na v krystalické podobě nebo ve formě roztoků používána v lékařství. Široké uplatnění nachází ve farmakologii jako nosič pro cílené uvolňování účinných látek. Zejména roztoky CMC-Na jsou pak díky svým viskoelastickým vlastnostem používány v oční chirurgii, kde je stejně jako kyselina hyaluronová využívána při extrakci kataraktu, operacích glaukomu, implantaci očních čoček i keratoplastice [17].

#### 2.2.5 Konformace

Velký vliv na chování roztoků CMC-Na má průměrná délka řetězce, stupeň substituce, molekulová hmotnost a také koncentrace a pohyblivost řetězců. Více hydrofobní CMC-Na (s nižším  $DS$ ) jsou tixotropní látky, naopak delší řetězce s vyšším stupněm substituce vykazují pseudoplastické chování (viz část 2.4.2.1). Při nízkém  $pH$  se mohou CMC-Na řetězce prostřednictvím vazeb mezi karboxylovou skupinou a volnými hydroxylovými skupinami křížit [18].

Ve studii [18] se Kastner se svými spolupracovníky zabývá především srovnáním vodných roztoků osmi komerčních vzorků CMC-Na s molekulovou hmotností  $9000\text{--}360\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $DS = 0,75\text{--}1,47$ . Z reologických měření odlišili čtyři kritické koncentrace ( $c_1\text{--}c_4$ ), které jsou závislé na molekulové hmotnosti vzorků, hustotě náboje polyelektrolytu a iontové síle roztoků. Prokázali, že ve velmi nízké koncentraci polyelektrolytů (nižší než  $c_1$ ) jsou vzdálenosti mezi řetězci větší než rozměry klubek a ta jsou vzájemně izolována. To platí až do molekulové hmotnosti  $30\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Při vyšších koncentracích než  $c_2$  se natažené řetězce začnou překrývat a vzorky vykazují nárůst viskozity. S dalším zvýšením koncentrace polyelektrolytu ( $c_3$ ) se začnou překrývat již svinuté řetězce a tato koncentrace se vyznačuje silným nárůstem viskozity. Pro roztoky o ještě vyšší molekulové hmotnosti a koncentraci ( $c_4$ ) je pozorováno chování jako u termoreverzibilního gelu.

Zvýšením iontové síly a snížením  $pH$  se zároveň snižuje i viskozita roztoků záporně nabitých polyelektrolytů [19]. Tzn., že polymerní doména kontrahuje a klubko se stává více stočené. K tomuto chování dochází např. přidávkou jednomocného iontu  $\text{Na}^+$ . V případě, že je přidán polyvalentní ion např.  $\text{Ca}^{2+}$  ve formě chloridu vápenatého je vzorek schopen se fyzikálně síťovat s polymerním řetězcem prostřednictvím elektrostatických sil. V přítomnosti většího množství  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se tvoří silnější gel, v porovnání se situací, kdy je koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů příliš nízká, jako v případě alginátu prokázali Nokhodchi a Tailor [19].

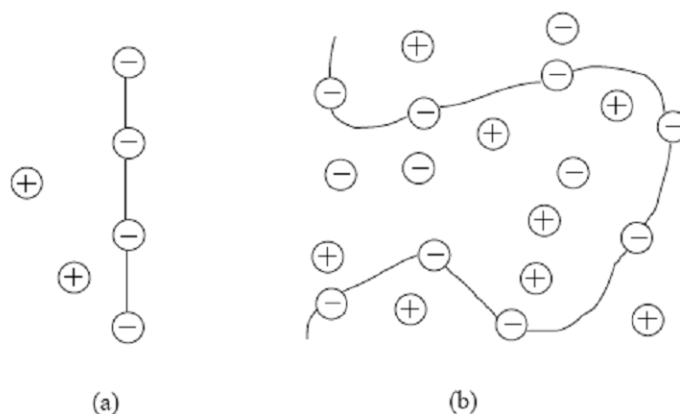
## 2.3 Roztoky lineárních polyelektrolytů a jejich viskozita

Polyelektrolyty jsou vysokomolekulární látky, které v molekule obsahují skupiny schopné elektrolytické disociace. Ať už v případě hyaluronanu či karboxymethylcelulózy sodné to jsou karboxylové skupiny, které nesou elektrický náboj. Disociací výše uvedených látek tedy vzniká *makroanion* s velkým počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného náboje, zvaných *protiionty* (v obou případech to jsou  $\text{Na}^+$ ). Protože jsou karboxylové skupiny slabě kyselé, disociují pouze do určitého stupně.

Chování takových makromolekul v roztoku je ovlivněno kromě mezimolekulárních disperzních sil hlavně silami elektrostatickými. Těchto interakcí se zúčastňují náboje ionizovaných skupin řetězce a náboje malých iontů přítomných v doméně a v okolí makroiontu. Elektrostatické interakce hrají klíčovou roli ve studiu viskozity roztoků. Dále se také uplatňují vodíkové vazby mezi molekulami vody a OH skupinami makroanionu.

V případě zředěného roztoku polyelektrolytu v nepřítomnosti soli jsou jednotlivé makroionty od sebe izolovány oblastí disperzního prostředí. Oddisociované protiionty mají proto tendenci do této oblasti expandovat. Tím dochází ke snížení jejich koncentrace, takže jejich odstiňující účinek elektrostatických sil je nepatrný. Makroanion obsahující pouze náboje stejného znaménka se tedy jen velmi málo svinuje do klubka a v roztocích existuje spíše ve formě nataženého řetězce (Obr. 4a). To je právě způsobeno odpudivými silami mezi souhlasně nabitými skupinami. Se zvyšující koncentrací polyelektrolytu roste také koncentrace protiiontů a tím se také zvyšuje odstiňující účinek na odpudivé interakce mezi náboji makroanionu. Viskozita roztoku je pak zvláště vysoká.

Malé ionty (tj. protiionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí) vytvářejí kolem centrálního iontu na nabitém řetězci hyaluronanu či CMC-Na *iontovou atmosféru* opačného náboje. Prostorové rozložení těchto iontů je dáno rovnováhou mezi elektrostatickými silami a účinkem tepelného pohybu iontů. Iontová atmosféra zeslabuje odpudivý účinek nábojů řetězce a to tím více, čím je koncentrace malých iontů vyšší. Změna iontové síly tedy vyvolává výrazné změny konformace makroiontu. Je-li do roztoku přidán právě nízkomolekulární elektrolyt, stoupá iontová síla roztoku, iontová atmosféra kolem nabitých skupin se stlačuje a může se více uplatnit vliv tepelného pohybu na svinutí makromolekuly v klubko. Již malými přídávky elektrolytu se původně natažený řetězec svinuje a viskozita roztoku klesá (Obr. 4b). Molekula se blíží takovému stupni svinutí, který odpovídá nenabitému řetězci. Účinek elektrolytů roste s valencí iontu opačného náboje, než je náboj makromolekuly [15, 19, 20, 21].



**Obr. 4** Konformace makroiontu: (a) v krajně zředěném roztoku v nepřítomnosti soli, (b) v přítomnosti soli

Pořadí přídavku malých iontů do roztoku hraje důležitou roli. Pokud je polyelektrolyt rozpuštěn ve vodě před přídavkem soli, pak má sůl minimální vliv na viskozitu roztoku. Naopak v případě přídavku polyelektrolytu až po rozpuštění soli, výsledkem je mnohem nižší viskozita. Ionty soli rychle zastíňují rozpuštěné CMC-Na řetězce a zastavují tak expanzi. Čím vyšší je koncentrace iontu, tím více dochází ke kontrakci, což vede k většímu poklesu viskozity [15].

Vnitřní viskozita má úzký vztah s hydrodynamickým poloměrem. Se vzrůstajícím rozměrem klubka vzrůstá viskozita roztoků [20, 21].

### 2.3.1 Současný stav problematiky

Systémy zajišťující uvolňování léčiv byly v posledních desítkách let intenzivně studovány. V současné době se výzkum zaměřuje na polymery. Síťování je jedna z hlavních metod propojování řetězců vedoucí ke vzniku hydrogelů. Ty jsou schopny absorbovat velké množství vody, jež hydratuje hydrofilní domény v polymerní síti. Síťování řetězců se využívá k zabránění rozpouštění, což je vhodné pro prodloužení uvolňování léků. Studium chování roztoků CMC-Na je celosvětově věnována velká pozornost. Zkoumány jsou především změny vlastností CMC-Na vyvolané množstvím a typem přidaného (poly)valentního kationu, stupněm substituce nebo molekulovou hmotností CMC-Na samotné. Systém zapletené sítě se vyskytuje u polymerních roztoků, u nichž koncentrace polymeru převyšuje určitou kritickou koncentraci [18]. Při studiu chování polymerních roztoků je často využíváno reologických měření, resp. viskoelastických testů, které jsou vhodné pro charakterizaci interakcí mezi řetězci, jejich proplétání a struktury polymerní sítě vůbec [19, 22].

Mezi materiály často využívanými při očních chirurgických operacích patří roztoky HA-Na, které jsou charakteristické svými vhodnými viskoelastickými vlastnostmi. Nicméně tato látka je velmi drahá, proto se výzkum zaměřuje také na CMC-Na, jenž má obdobné vlastnosti. Stupeň substituce i molekulová hmotnost jsou kritickými parametry při definování viskoelastických vlastností pro použití v přední oční komoře. Žádoucí jsou roztoky CMC-Na se DS vyšším než 0,4 a molekulovou hmotností vyšší než 500 kDa, protože vzniklé roztoky jsou již v nízké koncentraci (1,5% hm.) vysoce viskózní. Pro danou aplikaci je důležité, aby viskozita roztoku byla vyšší než 1000 Pa.s [23].

Výzkum zaměřený na posouzení účinnosti CMC-Na při léčbě suchého oka byl realizován Bruixem [17]. Jeho výzkumný tým vyšetřil 19 pacientů a u mírné nebo středně těžké formy suchého oka provedl i následné léčení. Pacientům byl 1x za 3 měsíce podáván 0,5% hm. izotonický roztok CMC-Na do jednoho oka a do druhého pouze klasický izotonický roztok. Výsledky zjištěné po 1 roce ukázaly výrazný pokles negativních příznaků a také zvýšení stability vrstvy slzného filmu u oka léčeného prostřednictvím CMC-Na. To má ve skutečnosti za následek zlepšení povrchu rohovky a také lepší smáčivost slzné vrstvy. Tento fakt bývá zohledněn i při výrobě přípravku využívaných ve viskochirurgii.

Tématikou možného použití jako nosiče léčiv pro řízené uvolňování se zabývali Michailova a kol. [22]. Studium bylo zaměřeno na chování gelové vrstvy, která tvoří hydrofilní matici a má velký význam pro způsob uvolňování léčiv. Pro své experimenty použili 1% hm. vodný roztok CMC-Na se stupněm substituce 0,65–0,90. Z naměřených hodnot byl zřejmý vliv iontového prostředí a pH na elastické a viskózní chování gelů. Zároveň se ukázalo, že k vysoké korelaci mezi procesem uvolňování léčiv a viskoelastickými parametry dochází pouze při nízkých frekvencích.

Podobným výzkumem se zabývali také Nokhodchi se svými spolupracovníky [19], kteří studovali síťování alginátu sodného pomocí různě koncentrovaných roztoků  $\text{CaCl}_2$ . Cílem jejich studie bylo prodloužit dobu uvolňování účinné látky theofylinu z alginátu. Ukázalo se, že pomalejší uvolňování léčiva bylo docíleno při zvýšení koncentrace přidaného elektrolytu.

Srovnání vlivů přidávaných kationů se věnovali rovněž Brito se spolupracovníky ve své studii [24], kde byl zkoumán polysacharid ze stromů *Sterculia striata*. Tento polysacharid obsahuje ve své struktuře jednotky galaktózy, rhamnózy a kyseliny galakturonové a glukuronové. Autoři se zaměřili především na závislost reologických vlastností tohoto polymeru a interakcí kovových iontů na struktuře a složení. Byly měřeny roztoky v rozsahu koncentrací 0,1–1% hm. v 0,1M NaCl. Newtonské chování bylo pozorováno u roztoků do 0,2% hm. Pseudoplastické chování se projevilo až po překročení této kritické koncentrace. Roztoky s přísady  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$  byly připraveny při stejné iontové síle ( $I=1$ ). V přítomnosti  $\text{Al}^{3+}$  byly pozorovány silné řetězové kontrakce, zatímco u přísady  $\text{Na}^+$  měl polysacharid nejméně smrštěnou konformaci. Vzorek v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  vykazoval vlastnosti nacházející se někde mezi zmíněnými charakteristikami ostatních protiiontů. Deacetylace polysacharidu vedla ke zvýšení pohyblivosti řetězců.

## 2.4 Reologie

Reologie je vědní obor, který se zabývá tokem a deformací látek vlivem působení vnějších mechanických sil. Pokud přestanou síly působit, deformovaná látka se může chovat různým způsobem.

Ideální pevné látky (hookovské) a část polymerů se vrátí do původního stavu, přičemž taková přechodná deformace se označuje jako vratná neboli elastická. K deformaci je potřeba energie, která se uvolní zpět, pokud vnější síla na materiál přestane působit.

Pro ideální kapaliny (newtonské) je naopak charakteristické viskózní chování. Po zrušení vnější síly zůstanou ve stavu, do kterého byly jejím působením přivedeny. V tomto případě jde o deformaci trvalou neboli tok. Těleso mění svůj tvar po celou dobu působení síly a to tím rychleji, čím větší je tato síla a čím menší jsou vnitřní síly, kterými kapalina klade deformaci odpor. Energie potřebná k deformaci je disipována ve formě tepla a nemůže být proto vrácena zpět po odstranění napětí.

Mezi těmito dvěma extrémami existují systémy, jejichž odezva na aplikovanou sílu záleží na době, po kterou tato síla působí. Nazývají se *viskoelastické*. Mezi ně patří řada koloidně disperzních systémů [20, 21].

Reologie tedy studuje vztah mezi napětím a deformací v reálných látkách, jejichž tokové vlastnosti matematicky vyjadřují konstitutivní rovnice. Grafickou podobou jsou tokové křivky, nazývané reogramy [25].

### 2.4.1 Newtonské kapaliny

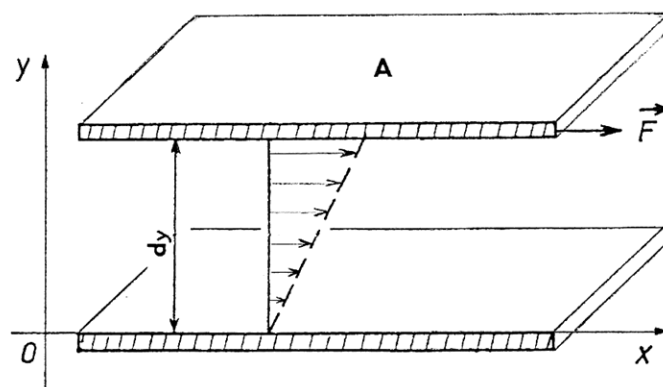
V případě ideálně viskózního materiálu lze Newtonův zákon psát ve tvaru

$$\sigma = \eta \cdot \frac{dv_x}{dy} = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

kde tečné napětí  $\sigma$  [ $\text{Pa} = \text{N} \cdot \text{m}^{-2}$ ] je lineárně závislé na gradientu rychlosti mezi myšlenými vrstvami tekutiny  $\dot{\gamma}$  [ $\text{s}^{-1}$ ].

Konstantou úměrnosti je dynamická viskozita  $\eta$  [ $\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2} = \text{kg}\cdot(\text{s}\cdot\text{m})^{-1}$ ] charakterizující vnitřní odpor kapaliny, který vzniká jako důsledek chaotického tepelného pohybu částic a mezimolekulárních přitažlivých sil.

Kapalinu lze myšleně rozdělit na vrstvy rovnoběžné se směrem toku, z nichž každá se pohybuje poněkud jinou rychlostí (Obr. 5).



**Obr. 5** Schématické znázornění tekoucí oblasti mezi dvěma paralelními deskami [26]

Jestliže hybná síla  $F$  [N] působí na element plochy  $A$  [ $\text{m}^2$ ] rovnoběžně se směrem toku, pak je smykové napětí  $\sigma$  definováno jako

$$\sigma = \frac{F}{A}. \quad (2)$$

Smyková rychlost  $\dot{\gamma}$  [ $\text{s}^{-1}$ ] popisuje, jak rychle se tekoucí vrstvy pohybují navzájem vůči sobě při laminárním proudění. Je definována jako podíl rozdílu průtokových rychlostí  $dv_x$  [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ] ve směru osy  $x$  mezi tekoucími vrstvami oddělenými vzdáleností  $dy$  [m] [25, 27]

$$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy}. \quad (3)$$

V případě newtonských kapalin závisí dynamická viskozita pouze na okamžité teplotě a tlaku v kapalině, naproti tomu nezávisí na čase, ani na aplikovaném smykovém napětí či rychlostním gradientu. U plynů s rostoucí teplotou stoupá, u kapalin naopak klesá [28]. Reciproká dynamická viskozita se nazývá fluidita neboli tekutost [20]

$$\varphi = \frac{1}{\eta}. \quad (4)$$

Podíl dynamické viskozity a hustoty tekutiny  $\rho$  [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ] definuje kinematická viskozita  $\nu$  [ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ]. Její využití je vhodné tehdy, kdy vazké tření, setrvačnost a gravitace jsou jediné působící síly [28].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (5)$$

Kapaliny, chovající se podle Newtonova zákona se označují jako newtonské a patří mezi ně běžné čisté kapaliny a pravé roztoky [29].

## 2.4.2 Nenewtonské kapaliny

Jedná se o kapaliny reologicky složitější, které se Newtonovým zákonem neřídí, proto se k jejich popisu využívají empirické modely s charakteristickými konstitutivními rovnicemi.

V porovnání s newtonskými kapalinami, jejich nenewtonská viskozita není konstantou při dané teplotě a tlaku, neboť závisí i na dalších faktorech jako je např. smyková rychlost nebo napětí kapaliny. Taková viskozita je označována jako zdánlivá.

Příkladem takových kapalin jsou roztoky a taveniny polymerů, různé pasty, tixotropní barvy, sinoviální tekutina nebo také krev [25].

### 2.4.2.1 Časově nezávislé nenewtonské kapaliny

U tohoto typu kapalin je viskozita závislá na rychlosti deformace, ale nezávislá na době působení smykového napětí [27].

Ostwald a de Wael předložili pro popsání vlastností této skupiny nenewtonských kapalin empirický vztah, označovaný jako tzv. „power-law model“ ve tvaru

$$\sigma_{xy} = K \cdot \dot{\gamma}^n, \quad (6)$$

kde  $K$  je koeficient konzistence a  $n$  je index toku (u newtonských kapalin platí  $n = 1$ ).

Pro vyjádření zdánlivé viskozity  $\eta$  lze „power law model“ formulovat jako [26]

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}. \quad (7)$$

Kapaliny v rámci „power law“ tečou při sebemenším napětí, a proto křivka závislosti smykového napětí na gradientu rychlosti prochází počátkem souřadnicového systému  $\sigma - \dot{\gamma}$  (Obr. 6). Je snadno použitelný pro slabé gely a nízko-viskozitní disperze [30].

### *Pseudoplastické kapaliny*

V případě tohoto typu kapaliny se zdánlivá viskozita v nízkých smykových rychlostech podobá newtonskému toku, ale se vzrůstající smykovou rychlostí klesá [25]. Tento jev je možno vysvětlit existencí asociačních struktur, které představují přechod ke spojitému síťování gelů. Tyto struktury nejsou souvislé, jelikož vlivem tepelného pohybu spoje neustále vznikají a opět zanikají. Se vzrůstajícím napětím se struktury rozbíjejí, a proto viskozita systému klesá [31]. Index toku odpovídá  $0 < n < 1$ . Představiteli tohoto typu kapaliny jsou disperze, emulze a vysokomolekulární polymery [27].

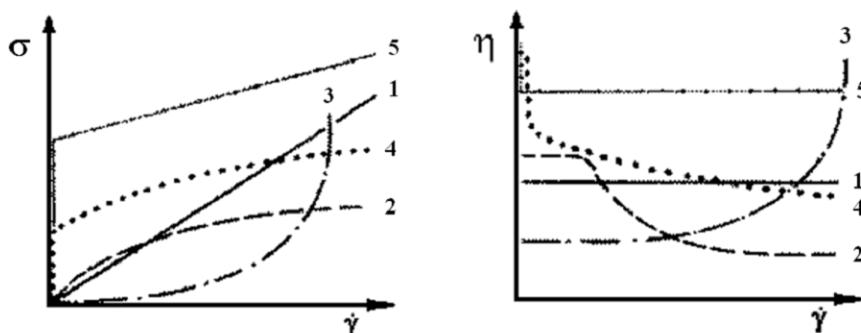
### *Dilatantní kapaliny*

Zde se zdánlivá viskozita se vzrůstající smykovou rychlostí zvyšuje. Pro index toku platí  $n > 1$ . Je příznačné pro vysoce koncentrované suspenze [25].

U pseudoplastických kapalin může existovat varianta s mezním smykovým napětím. Tyto *plastické soustavy* se chovají vůči malým napětím jako tuhá tělesa a deformují se jen elasticky. Počínaje určitou hodnotou napětí se struktura začne rozrušovat, dochází k trvalé deformaci a rychlostní gradient nabývá konečných hodnot [20]. Proto byl „power-law model“ dále rozšířen o tzv. mez toku, po jejímž překročení kapalina teprve začíná téci

$$\sigma_{xy} = \sigma_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n. \quad (8)$$

Kapaliny, jejichž toková křivka je ve tvaru přímky s nenulovou mezí toku a indexem toku  $n = 1$  se nazývají *Binghamské kapaliny* [27].



**Obr. 6** Tokové a viskozitní charakteristiky nenewtonských kapalin: 1 – newtonská kapalina, 2 – pseudoplastická kapalina, 3 – dilatantní kapalina, 4 – pseudoplastická s mezí toku (plastická), 5 – binghamská kapalina [27]

#### 2.4.2.2 Časově závislé nenewtonské kapaliny

Viskozita většiny reálných kapalin je často závislá na délce času, během kterého byla vystavena působení příslušného smykového napětí.

Jsou-li některé systémy po periodě klidu podrobeny smykovému namáhání, jeví vysokou zdánlivou viskozitu, která postupně klesá, dokud se neustaví rovnováha mezi rozrušováním a opětovným vytvářením struktur v systému. Je-li pak systém ponechán v klidu, původní struktury se opět obnoví. Tento jev, který je časově závislou obdobou plasticity, se nazývá *tixotropie*. Je důležitá např. v průmyslu barev.

Opačným jevem je *reopexie*, což je časově závislá analogie dilatance, kdy zdánlivá viskozita roste s dobou, po kterou působí napětí [20].

#### 2.4.3 Gely

Koloidní disperze tuhých látek v kapalinách mají schopnost vytvářet gely – *gelatinizovat*. Přecházet v gely mohou jak roztoky makromolekulárních látek, tak i lyofobní soly.

Z hlediska struktury je možno gely definovat jako systémy tvořené trojrozměrnou sítí, vytvářející souvislou strukturu, která prostupuje celým disperzním prostředím. Prostorová síť je tvořena spojováním disperzních částic vlivem chemických a fyzikálních sil. I když je disperzní prostředí kapalné, mají gely v důsledku existence prostorové sítě mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav.

Podle toho, zda je v gelu přítomno disperzní prostředí, jsou rozdělovány na *lyogely* a *xerogely* (je-li rozpouštědlem voda, používá se názvu *hydrogely*).

Dále jsou gely rozdělovány podle schopnosti navrátit se po vysušení do původního stavu na *reverzibilní* a *ireverzibilní*. Reverzibilní gely při vysušení zmenšují svůj objem přibližně o objem odstraněného rozpouštědla a přecházejí na kompaktní *xerogely*, obsahující pouze disperzní podíl. Při styku s disperzním prostředím přechází zpět do původního stavu tzv. *bobtnáním*, tj. schopností přijímat molekuly disperzního prostředí. Tyto vlastnosti vykazují makromolekulární gely. Ireverzibilní gely při vysušení takřka nezmenšují svůj objem, jsou však porézní. Při kontaktu s rozpouštědlem nepřechází do původního stavu [20, 21].

### 2.4.3.1 Gelatinizace roztoků vysokomolekulárních látek

Gelatinizace makromolekulárních látek spočívá ve tvorbě stálých a dostatečně trvanlivých spojů mezi jednotlivými molekulami, což vede ke vzniku prostorové sítě. Jednotlivé spoje molekul jsou označovány jako *styčné body* nebo *uzly* a vznikají působením sil chemické či fyzikální povahy.

V případě gelatinizace vlivem chemických vazeb se v podstatě jedná o přípravu gelu chemickou reakcí (kondenzační polymerace, adiční polymerace). Takové gely jsou označovány jako *kovalentně síťované gely*. Struktura gelů s chemickými vazbami je velmi pevná a zpět na roztok by je bylo možné převést jedině odbouráním chemických vazeb. Výsledný produkt by však byl jiné povahy, jelikož nelze vyloučit, že se odstraní i jiné vazby.

Druhou možnost představuje mezimolekulární působení fyzikálních sil (van der Waalsových, dipolárních sil, vodíkových vazeb), čímž vznikají *fyzikálně síťované gely*. Vzniku spojů fyzikálními silami lze docílit snížením afinity vysokomolekulární látky k rozpouštědлу. Toho lze dosáhnout např. přidavkem takového rozpouštědla, v němž je makromolekula málo rozpustná a rovněž tak snížením teploty. Uzlové oblasti fyzikálně síťovaných gelů se od kovalentních liší strukturou, velikostí, pevností a dobou trvání. Na těchto vlastnostech uzlů pak závisí především reologické chování gelů. Silné gely mají pevné spoje, což je činí elastickými a chovají se obdobně jako gely s kovalentními vazbami. Naopak uzly slabých gelů jsou málo trvanlivé, a proto se tyto sítě chovají elasticky jen při malých mechanických napětích. Vlivem větších napětí uzly zaniknou, síť se rozpadne a soustava se začne chovat jako velmi viskózní kapalina. Je-li systém ponechán v klidu, přechází opět samovolně v gel.

Na gelatinizaci má značný vliv teplota a koncentrace vysokomolekulární látky. S rostoucí teplotou roste intenzita tepelných pohybů jednotlivých segmentů makromolekuly, čímž je zabráněno vzniku trvanlivých styčných bodů a gel nevzniká. Gelaci lze tedy podpořit snížením teploty. Tvorbu gelu lze také usnadnit zvýšením koncentrace vysokomolekulární látky, neboť tím roste četnost kontaktů makromolekul nebo jejich částí a zvětšuje se tak počet spojů v objemové jednotce gelu [20, 21].

## 2.5 Viskozimetrie

### 2.5.1 Viskozita roztoků makromolekulárních látek

Roztoky makromolekulárních látek jsou soustavy tvořené rozpouštědlem (disperzním prostředím) a makromolekulami (disperzním podílem). Přítomnost velkých částic disperzního podílu obvykle významně mění viskózní chování kapalného disperzního prostředí. Mimo změny charakteru proudění v kapalině je nejpozorovatelnější změnou růst její viskozity, proto se roztoky makromolekulárních látek řadí mezi nenewtonské kapaliny. Pro vystižení odlišností od newtonského chování se při popisu viskozity disperzních soustav užívají následující veličiny [20, 29]:

Relativní viskozita  $\eta_{rel}$  je vyjadřována jako podíl viskozity disperzní soustavy  $\eta$  a viskozity čistého disperzního prostředí  $\eta_0$

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}. \quad (9)$$



Jestliže je viskozita pojata jako součet viskozity disperzního prostředí  $\eta_0$  a viskozity rozpuštěného polymeru  $\eta_p$

$$\eta = \eta_p + \eta_0, \quad (10)$$

potom podíl viskozity rozpuštěného polymeru  $\eta_p$  k viskozitě rozpouštědla  $\eta_0$  vyjadřuje inkrement relativní viskozity (dříve specifická viskozita)  $\eta_i$ , jež představuje vzrůst viskozity, vztažený na viskozitu čistého disperzního prostředí [27]

$$\eta_i = \frac{\eta_p}{\eta_0} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1. \quad (11)$$

Redukovaná viskozita  $\eta_{red}$  udává poměr inkrementu relativní viskozity k hmotnostní koncentraci disperzního podílu (vyjádřené v  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )

$$\eta_{red} = \frac{\eta_i}{w}. \quad (12)$$

Inherentní viskozita je definována podle vztahu

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{w}. \quad (13)$$

Limitní viskozitní číslo neboli vnitřní viskozita, jež je definováno jako společná limita redukované a inherentní viskozity pro nekonečné zředění, je vyjádřena vztahem (14) [20]

$$[\eta] = \lim_{w \rightarrow 0} \eta_{red} = \lim_{w \rightarrow 0} \eta_{inh}. \quad (14)$$

## 2.5.2 Měření viskozity

Přístroj, používaný na měření toku kapalin neboli reologických vlastností, se nazývá viskozimetr či reometr. Výběr viskozimetru závisí na druhu polymeru, rozpouštědla a způsobu stanovení. Podmínkou správného měření je vždy laminárnost proudění v celém rozsahu měření a dobře definovaná geometrie toku (možnost určení  $\dot{\gamma}$  a  $\sigma$ ) v případě nenewtonských kapalin.

### 2.5.2.1 Kapilární viskozimetry

Kapilární viskozimetry se řadí k typu výtokových viskozimetrů [27]. Pro průtok kapaliny kapilárou platí Poiseuillova rovnice. Potřebný rozdíl tlaků je vytvořen hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře. Měří se čas, za který proteče určitý objem kapilárou. Kapilární metoda je vhodná pro měření viskozity nepříliš viskózních newtonských kapalin [20].

### 2.5.2.2 Viskozimetry s padající koulí

Speciálním modelem viskozimetru s padající koulí je Höpplerův viskozimetr. Měření je založeno na Stokesově vztahu pro pád koule ve viskózním prostředí. Ve skleněné trubici, naplněné měřenou kapalinou, odkloněné o 5 až 10° od svislé polohy, se odvaluje kulička. Měří se doby průchodu kuličky mezi dvěma ryskami. Tento druh viskozimetru se hodí zejména pro měření viskozity velmi viskózních kapalin [31].

### 2.5.2.3 Rotační viskozimetry

V tomto případě je vzorek podrobován smyku mezi dvěma definovanými plochami rotujícími kolem společné osy. Je vyhodnocována odezva vzorku při různých rychlostech otáčení. Je vhodný zejména pro studium nenewtonských kapalin [27].

Při charakterizaci způsobu zpracování materiálů se uplatňuje měření ve vysokých smykových rychlostech prostřednictvím torzního reometru. Důležité je použít vhodnou měřicí geometrii, která je odvislá na zkoumaném výrobku. Zředěné kapaliny vyžadují válcový systém, při viskózních roztocích se uplatňuje systém kužel-deska a pro všechny další pevné materiály se používá geometrie deska-deska [28].

Pro všechny systémy měřené v rámci této práce se ukázalo vhodným použít geometrii kužel-deska. Toto uspořádání vytváří definovanou konstantní smykovou oblast i s velmi malým množstvím měřené kapaliny. Geometrická měření pomocí kužele jsou určena jeho poloměrem  $R$  a úhlem  $\alpha$ . Pro měření je obvykle používán úhel v rozmezí  $0,5\text{--}4^\circ$ , přičemž doporučován je  $\alpha = 1^\circ$ . V důsledku přímého kontaktu kužele s deskou by docházelo k chybám a poškození geometrie, proto je vrchol kužele zploštěn o  $30\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ . Měřicí poloha by měla být nastavena na tuto zanedbanou vzdálenost  $T$  (Obr. 7).

Při měření se kapalina umísťuje do úzké štěrbině mezi dvě plochy, z nichž jedna je v klidu a druhá vykonává rotační pohyb s konstantní úhlovou rychlostí  $\omega$  [ $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ] smykové deformace. Měřen je úhel  $\alpha$  v závislosti na rychlosti otáčení  $\omega$  rotujícího kužele, čímž je získávána smyková rychlost. Dále je měřen kroutivý moment  $M$  [ $\text{N}\cdot\text{m}$ ] na hřídeli, který představuje sílu potřebnou k otáčení.

Tento typ měřicího systému je vhodný pro všechny kapaliny a disperze s částicemi, které nejsou větší než  $1/5$  virtuální měřicí polohy. Podle průměru kužele se odlišuje jeho použitelnost pro různě viskózní materiály, přičemž pro viskóznější vzorky je používán kužel o menším průměru. Čím menší je průměr, tím větší je aplikované smykové napětí.

Konstantní smykové napětí pro uspořádání kužel-deska je závislé na poloměru podstavu kužele  $R$  podle

$$\sigma = \frac{3 \cdot M}{2\pi \cdot R^3}. \quad (15)$$

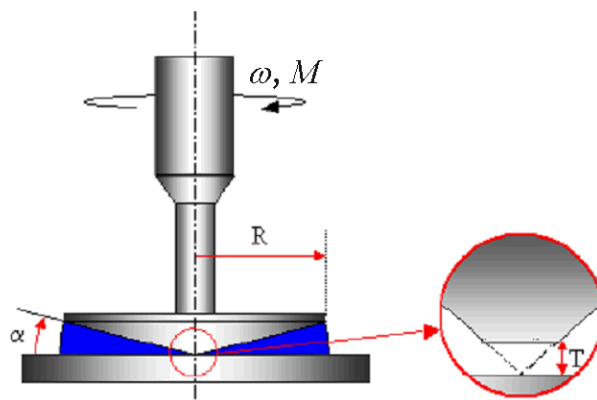
Čím větší je kuželový poloměr, tím více se zvyšuje citlivost při měření menších kroutivých momentů nebo smykových napětí. Smyková rychlost není závislá na poloze v měřicí štěrbině a platí pro ni vztah (16)

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\tan \alpha} = \frac{\omega}{\alpha}. \quad (16)$$

Rovnice předpokládá, že v malých úhlech  $\alpha$  platí  $\tan \alpha = \alpha$ . V tom spočívá oblíbenost tohoto systému, jež udržuje smykovou rychlost v celém objemu deformovaného vzorku konstantní.

Tokovou rovnici nenewtonských kapalin lze tedy určovat přímo z naměřených závislostí kroutivého momentu na úhlové rychlosti [27, 28]

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{3 \cdot M \cdot \alpha}{2\pi \cdot R^3 \cdot \omega}. \quad (17)$$



**Obr. 7** Schématické znázornění měřicí geometrie kužel-deska

## 2.5.3 Reologické testy

### 2.5.3.1 Rampový test napětí („ramp test“)

Rampový test je používán jako první z experimentů provedených na novém, neznámém vzorku. Při této metodě se aplikované smykové napětí průběžně zvyšuje s časem při konstantní teplotě. Tím se získává prvotní celkový odhad rozsahu viskozity, ve kterém by mělo být samotné měření provedeno [28].

### 2.5.3.2 Ustálený tok („steady state“)

Jestliže je známý rozsah smykového napětí, získaný prostřednictvím „ramp testu“, může být měřena závislost viskozity na smykové rychlosti za ustáleného toku. Viskozitní data jsou měřena pro každou hodnotu smykové rychlosti nebo smykového napětí za konstantní teploty, přičemž test začíná při nízké hodnotě rychlostního gradientu.

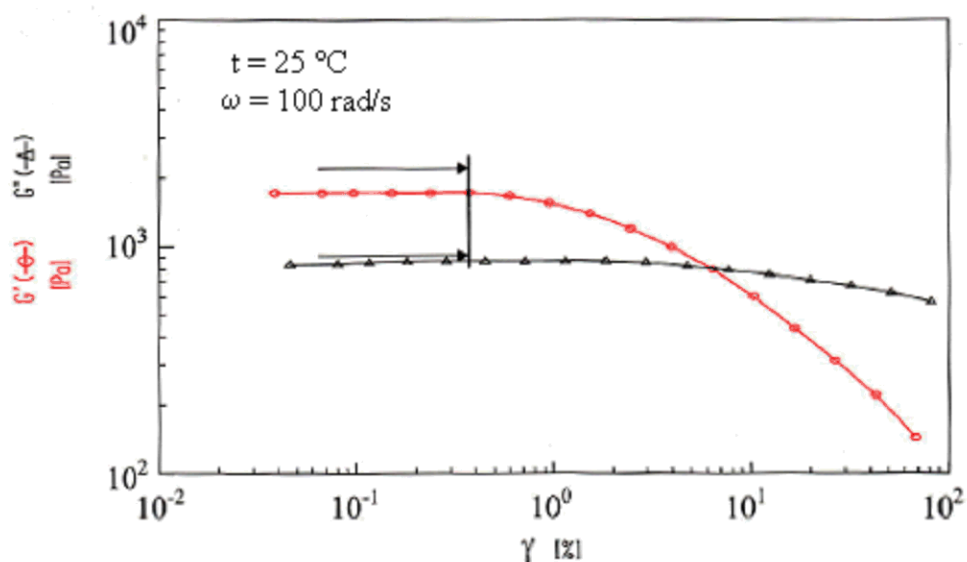
Čas je při tomto měření důležitým faktorem. Měřicí systém sám o sobě potřebuje určitou dobu pro dosažení požadované předprogramované hodnoty a také samotný vzorek potřebuje nějaký čas pro docílení rovnovážných podmínek (relaxace). Zároveň také platí, že čím nižší je smyková rychlost, tím déle bude trvat dosažení ustáleného toku, protože při těchto hodnotách se měřené vzorky liší nejvýrazněji. To rovněž znamená, že před začátkem měření se musí nastavit stabilizování systému na 5 či více minut a to z důvodu deformace vzorku v průběhu nanášení na měřicí systém. Jelikož účelem tohoto experimentu je získání tokové křivky, je potřeba změřit několik bodů a brát v potaz dobu s tím spojenou [28].

### 2.5.3.3 Amplitudový test („strain sweep test“)

Tato zkouška je také známá pod pojmem deformační test. Na vzorek je aplikováno napětí za konstantní teploty a frekvence. Jako odezva jsou získávány moduly  $G'$  a  $G''$ , které běží téměř paralelně v nižším frekvenčním rozsahu. Lineární rozsah je také nazýván jako *lineární viskoelastický režim* (lineární viskoelastická – LVE), kde moduly jsou konstantní a nezávislé na deformaci. V této oblasti pak probíhá oscilační měření při různých frekvencích.

Jak je ukázáno na Obr. 8, experiment běží při úhlové frekvenci  $100 \text{ rad.s}^{-1}$  a teplotě  $25^\circ\text{C}$ . Znázorněné moduly  $G'$  a  $G''$  v závislosti na frekvenci jsou zobrazeny v logaritmickém měřítku. Je zřejmé, že při deformaci přibližně 0,4 % (v obrázku znázorněno svislou čarou), paměťový modul  $G'$  (červená křivka) opouští lineární oblast.

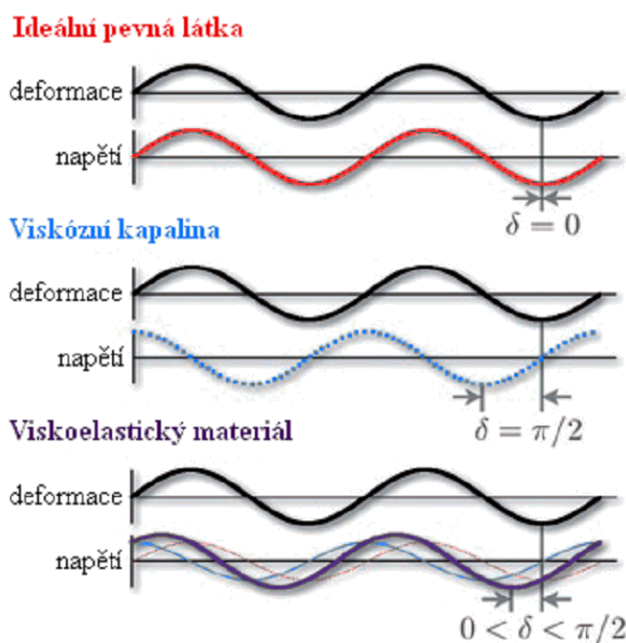
Dvě měření mohou být srovnávána za předpokladu, že jejich okrajové podmínky jsou zachovány pro oba případy. Pokud by při analýze amplituda opouštěla lineární rozsah, byly by získány odlišné výsledky. Proto je nutné měřit právě v této oblasti LVE.



**Obr. 8** Stanovení lineárního viskoelastického režimu pomocí amplitudového testu [28]

#### 2.5.3.4 Frekvenční test („frequency sweep test“)

Po určení LVE oblasti prostřednictvím deformačního testu, následuje studium frekvenční závislosti. Testování obvykle začíná při nejvyšší frekvenci a následně je snižována v logaritmických krocích [28].



**Obr. 9** Schematické znázornění odezvy napětí na oscilační napětí deformace pro elastické pevné látky, viskózní tekutiny a viskoelastické materiály (komentář str. 25) [32]

Oscilační měření je založené na sinusoidální smykové deformaci vzorku, při níž se měří výsledná odezva napětí [32]. Zvolená frekvence  $\omega$  udává periodu kmitání [28]. Měření této časové závislosti odezvy napětí při jednotlivém kmitočtu odkrývá hlavní rozdíly mezi materiály (Obr. 9).

Jestliže je materiálem ideální elastická látka, pak napětí vzorku je úměrné deformaci, jsou ve stejné fázi a ztrátový úhel je tím pádem nulový. Naproti tomu, pokud je materiálem ideální viskózní kapalina, potom napětí ve vzorku je úměrné rychlosti deformace. Aplikovaná deformace a naměřené napětí jsou ve fázovém posunu  $\pi/2$ . Viskoelastické materiály vykazují odezvu, která leží mezi oběma extrémními případy. Celková odezva napětí (Obr. 9, fialová křivka) značí fázový posun  $\delta$ , který leží mezi pevnými látkami a kapalinami,  $0 < \delta < \pi/2$  [32].

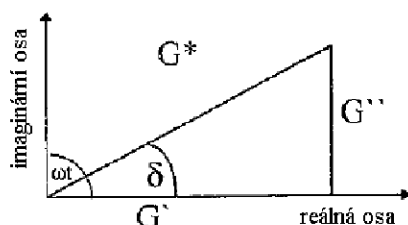
V průběhu měření dochází ke zvyšování oscilačního napětí působícího na vzorek, zatímco jsou sledovány reologické parametry, mimo jiné komplexní modul  $G^*$  a ztrátový úhel  $\delta$  [30].

Komplexní modul  $G^*$  vyjadřuje celkovou mechanickou odolnost vůči deformaci materiálu a to bez ohledu na to, zda se jedná o deformaci vratnou (elastické látky) nebo nevratnou (viskózní kapaliny). Při hodnocení dané látky platí, že čím je komplexní modul vyšší, tím je materiál tužší, a tedy tím více odolává působícím silám. Naopak čím je modul nižší, tím je vzorek měkčí a tím lépe se deformuje. Jednotkou komplexního modulu je Pascal (Pa).

Tento modul je v podstatě komplexní číslo s imaginární a reálnou složkou (18), kde reálná část je označována jako paměťový modul  $G'$  a imaginární část jako modul ztrátový  $G''$  (Obr. 10). Tyto moduly popisují příspěvky pevných látek a kapalin pro měřenou odezvu napětí a jsou funkcí frekvence.

$$G^* = [G'; G''] = G' + iG'' \quad (18)$$

- Paměťový modul  $G'$  – vyjadřuje míru elastického chování.
- Ztrátový modul  $G''$  – vyjadřuje míru viskózního chování [28, 30]



**Obr. 10** Schématické znázornění komplexního modulu  $G^*$

Ztrátový úhel  $\delta$  je mírou disipace energie uvnitř materiálu a také vyjadřuje přítomnost elastické struktury (gelu). Nabývá hodnot v intervalu  $0-90^\circ$ .

- $\delta > 45^\circ$  materiál má viskózní charakter
  - $\delta < 45^\circ$  materiál má elastický charakter
  - $\delta = 45^\circ$  materiál obsahuje rovnou měrou elastickou i viskózní složku,  $G' = G''$ ,  $\tan \delta = 1$
- Je definován jako poměr ztrátového a paměťového modulu (19) [28, 30].

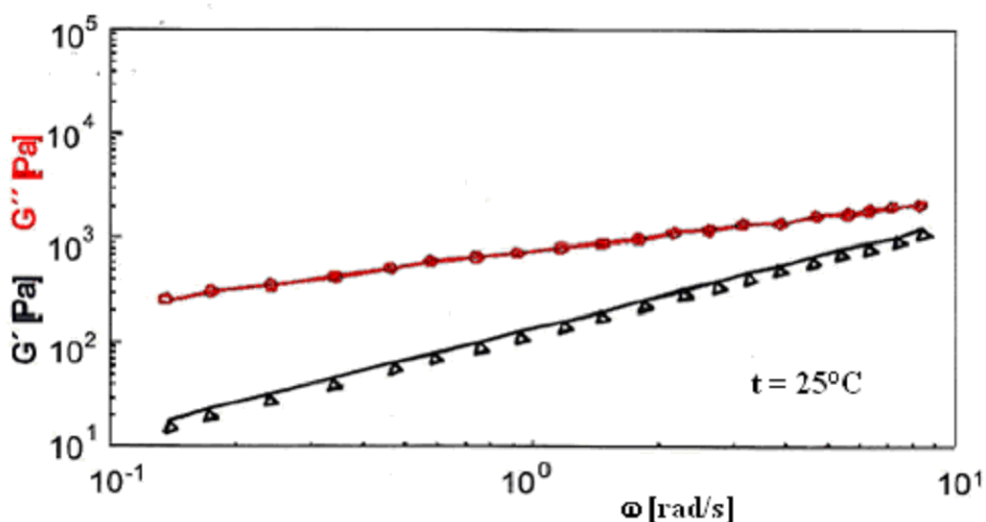
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (19)$$

Materiály, jejichž odezva je viskoelastická, se označují jako *plastické*. Pomocí oscilační reologie lze kvantifikovat jak viskózní, tak elastické vlastnosti materiálů v různých časových režimech [32].

## 2.5.4 Síťování polymerů

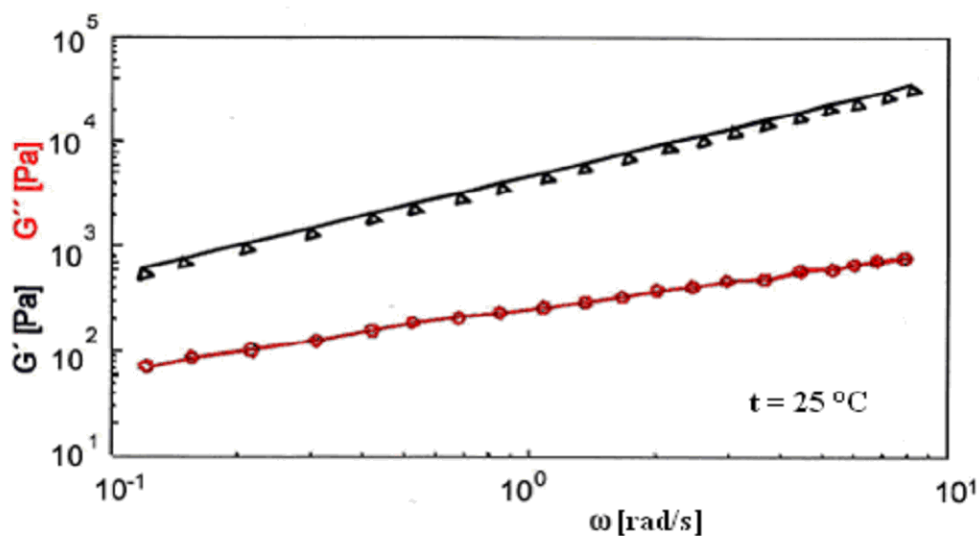
Informace o stupni síťování poskytují křivky paměťového  $G'$  a ztrátového modulu  $G''$ , resp. jejich vzájemná vzdálenost a postavení při různých frekvencích.

Pro nesíťované polymerní roztoky je viskózní část větší než elastická a to v celém frekvenčním rozsahu (Obr. 11, červená křivka). Jak už také termín „polymerní roztok“ naznačuje, jedná se především o kapalinu (malá část polymeru v rozpouštědle). Proto ztrátový modul  $G''$  leží v grafu výše než  $G'$ .



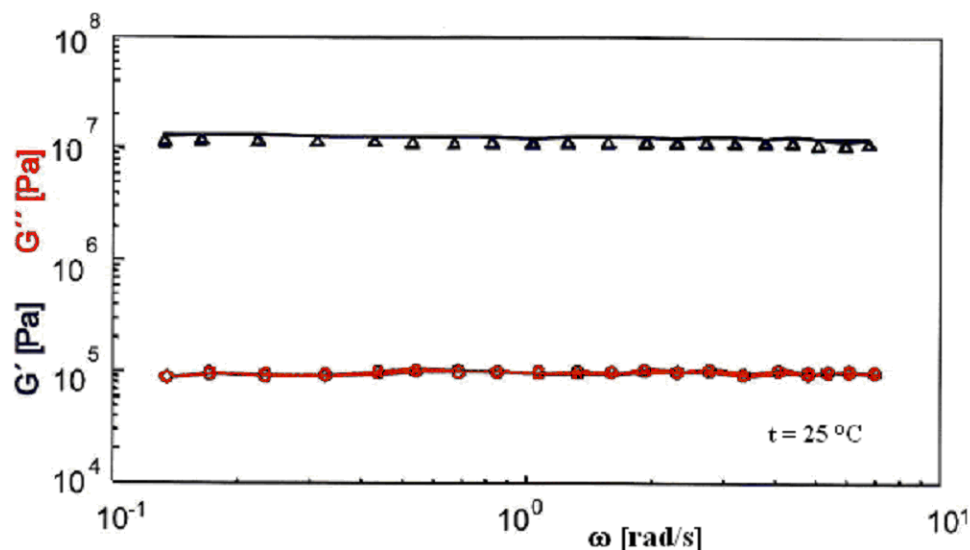
Obr. 11 Nesíťovaný polymerní roztok

V případě částečně zesíťovaného polymeru převládá paměťový modul  $G'$  nad ztrátovým modulem  $G''$  v měřeném rozsahu frekvencí, jakož i jeho sklon vzrůstá se zvyšující se frekvencí (Obr. 12).



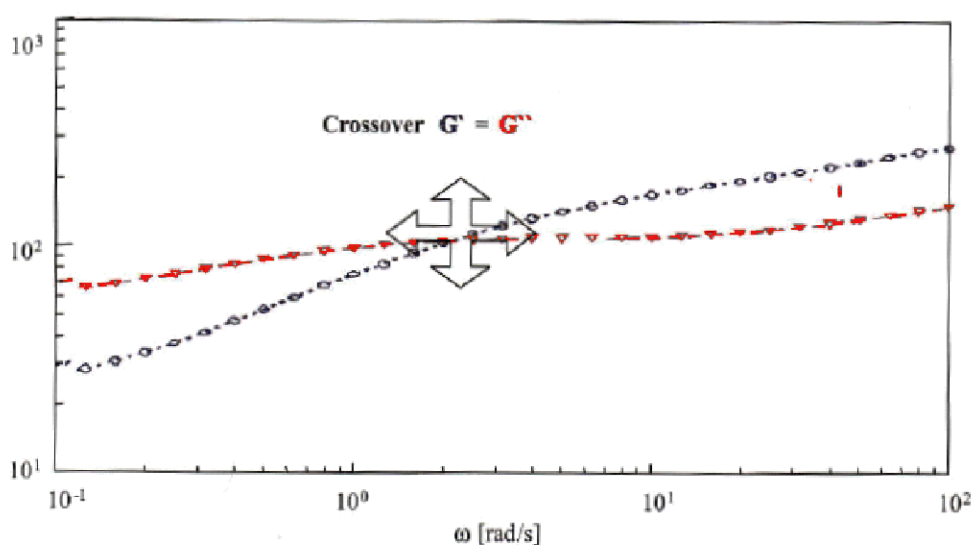
Obr. 12 Částečně síťovaný polymer

V případě plně síťované struktury polymeru opět převládá elastický modul nad viskózním, jako tomu je u předešlého příkladu (obr. 12). Zde jsou však moduly od sebe velmi vzdáleny a křivky paměťového a ztrátového modulu běží takřka paralelně nad sebou a to s rozdílem téměř dvou řádů (Obr. 13). Z reologického pohledu se tedy jedná o pevnou látku.



**Obr. 13** Rozložení modulů, které charakterizují plně síťovaný polymer

Na Obr. 14 jsou zobrazeny křivky charakteristické pro hydrogel. Místo, kde dochází k překřížení dvou modulů, je známé jako „crossover”. Při nízkých frekvencích dominuje viskózní část nad elastickou a vzorek se chová jako kapalina. Se vzrůstajícím kmitočtem roste paměťový modul jasně rychleji. Nad určitou frekvencí pro daný výrobek převládá paměťový modul  $G'$  nad ztrátovým  $G''$ . To znamená, že vnitřní struktury již nemohou vydržet rychlé deformace dějící se při této a vyšších frekvencích. Tato charakteristická vlastnost může být použita k nastavení výrobního procesu pro toto frekvenčně závislé měření.



**Obr. 14** Typické křivky paměťového a ztrátového modulu pro hydrogel [28]

## 2.6 Počítačové simulace

Počítačová chemie byla definována A. J. Hopfingerem jako „*kvantitativní modelování chemického chování na počítači metodami teoretické chemie*“. Intenzivní používání výpočetních metod v chemii je v současnosti způsobeno jejich nezastupitelnou rolí ve třech typech úloh. Výpočetní metody v první řadě poskytují hlubší pohled na specifické chování systému a umožňují získat informace, které se jen obtížně získávají experimentální cestou (případně se nedají získat vůbec). Další aplikací výpočetních metod v chemii je racionální plánování experimentů – je možné vyhodnotit vícero alternativ předtím, než se experiment uskuteční, čímž se umožní mnohem efektivnější využití dostupných zdrojů. Při vzrůstající ceně pracovní síly a stoupajícím výkonu výpočetních prostředků nabývá tato oblast využití výpočetní chemie stále většího významu. Za třetí, počítačové metody se mohou využít na studium systémů za extrémních podmínek, které se nedají dosáhnout v laboratoři (velmi vysoké tlaky a teploty) [33].

### 2.6.1 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (MD) je jednou z metod umožňujících studium chování systémů molekul. Spočívá v řešení soustavy Newtonových pohybových rovnic. Vzhledem k velkému počtu interagujících bodů (atomy) je nutno soustavy řešit pouze numericky, přičemž existuje řada algoritmů, které jsou implementovány do výpočetních programů.

Pro provádění MD simulací je třeba zjistit velikost sil, které působí mezi jednotlivými molekulami. Tyto síly lze v principu získat pomocí metod kvantové mechaniky, ale pro větší systémy je tato metoda nepoužitelná. Pro simulace velkých systémů (včetně biomolekul) se používají tzv. silová pole („force field“), která představují zjednodušený model pro mezimolekulární interakce. V nejběžnější variantě je každá molekula chápána jako souhrn atomů, které na sebe vzájemně působí modelovými silami. Jednou z nejběžnějších možností je toto působení dáno součtem Lennard-Jonesova potenciálu a elektrostatických interakcí, které je možno pro atomy typu  $i, j$  psát

$$u_{i,j}(r) = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0} \frac{q_i q_j}{r}, \quad (20)$$

kde  $\varepsilon$  a  $\sigma$  představují parametry L-J potenciálu (hloubka energetického minima a průměr atomů),  $q_i q_j$  jsou parciální náboje příslušných atomů,  $\varepsilon_r$  a  $\varepsilon_0$  jsou relativní permitivita a permitivita vakua a  $r$  značí vzdálenost mezi atomy. Pro velikost sil působících mezi interakčními centry tedy platí

$$|\vec{f}_{i,j}(r)| = \frac{24\varepsilon}{r} \left[ 2 \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0} \frac{q_i q_j}{r^2}, \quad (21)$$

přičemž směr působící síly je totožný se spojnicí atomů  $i, j$ . Celková síla působící mezi molekulami  $A$  a  $B$  je pak dána součtem příspěvků mezi atomy tvořící molekuly (22)

$$\vec{F}_{A,B} = \sum_{i,j} \vec{f}_{i,j}(r). \quad (22)$$

Poloha jednotlivých atomů v rámci molekuly je dána souborem tzv. intramolekulárních parametrů, které představují délky vazeb, velikosti vazebných a torzních úhlů. Silové pole tedy představuje souhrn parametrů  $\varepsilon$ ,  $\sigma$  a  $q$ , vazebných délek, úhlů a parametrů torzních



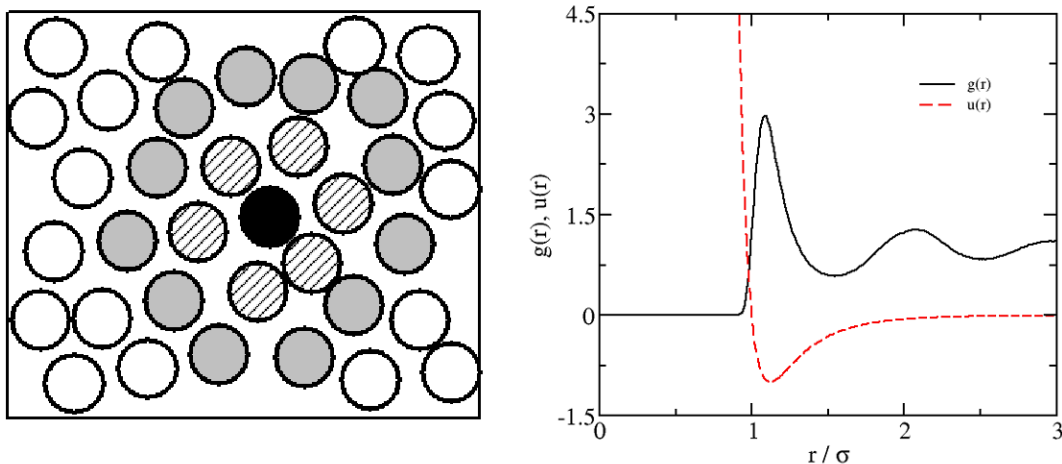
interakcí pro různé typy atomů. V případě simulací jiných systémů (např. kovy, tuhé materiály) se však můžeme setkat se silovými poli s výrazně odlišnou funkční formou.

Výsledkem MD simulací je tzv. trajektorie, která představuje časový vývoj poloh a rychlostí jednotlivých molekul. S ohledem na znalost působení mezi jednotlivými molekulami je možné z těchto trajektorií získat fyzikální vlastnosti systému jako celku (vnitřní energie, tlak...) Mimo to umožňují MD simulace detailní náhled na strukturu a uspořádání molekul v systému. Jedním z aparátů použitelných pro popis struktury je pomocí formalismu radiálních distribučních funkcí (rdf). Radiální distribuční funkce  $g_{ij}(r)$  udává rozdělení vzdáleností mezi atomy typů  $i$  a  $j$ . Přesněji, rdf odpovídá poměru lokální hustoty částice typu  $j$  v kulové vrstvě s poloměrem  $r$  a tloušťkou  $\Delta r$  a se středem v částici  $i$  a celkové hustoty částic typu  $j$

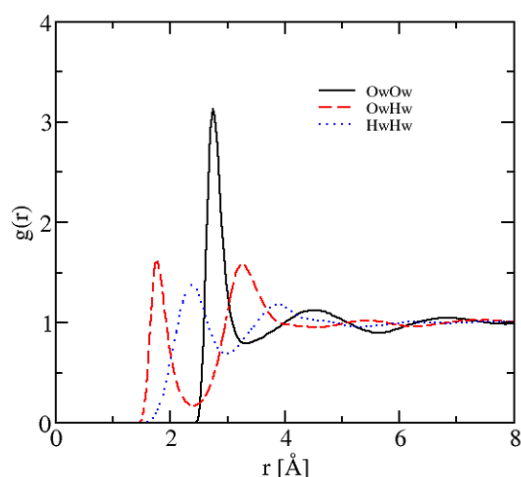
$$g_{ij}(r) = \left\langle \lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{1}{\rho_j} \frac{N_j}{4\pi r^2 \Delta r} \right\rangle. \quad (23)$$

Lomené závorky značí kanonické vystředění, tj. průměrnou hodnotu z dlouhodobého pozorování.

Závislost rdf na vzdálenosti je spojitá křivka tvořená maximy a minimy, přičemž maxima odpovídají zvýšení hustoty v dané vzdálenosti, např. v důsledku přitažlivých interakcí. Minima jsou potom způsobena sníženou schopností molekuly nacházet se v dané vzdálenosti, např. z důvodu obsazení prostoru jinou částicí. V Obr. 15 (vpravo) je ukázán průběh rdf (plná křivka) a interakčního potenciálu (přerušovaná křivka) pro Lennard-Jonesovu tekutinu při trojné teplotě (vhodným reprezentantem takového systému je např. kapalný argon při své trojné teplotě). Na sousedním obrázku (Obr. 15 vlevo) je schématicky znázorněná struktura této tekutiny. Černě označená částice přitahuje všechny sousední molekuly, nicméně tyto nemohou s danou částicí zcela splynout, nýbrž se vyskytují nejpravděpodobněji ve vzdálenosti odpovídající minimu mezičásticového potenciálu ( $r = 1,12 \sigma$ ). Tito sousedé (v obrázku 15 vlevo označeny šrafováním) přitahují další a další částice, zároveň však svým vyloučeným objemem brání přístupu těchto částic blíže k centrální molekule. To se na průběhu rdf projeví lokálním minimem kolem  $r = 1,5 \sigma$ . Druhé lokální maximum na průběhu rdf (v okolí  $r = 2 \sigma$ ) pak odpovídá zvýšené hustotě v této oblasti díky molekulám patřícím do druhé solvatační vrstvy centrální molekuly (částice označené šedě v schématu). Se vzrůstající vzdáleností jsou polohy částic méně korelovány a proto nabývá rdf limitní hodnoty  $g(r) = 1$ .



**Obr. 15** Schématické zobrazení jednoduché tekutiny (vlevo) a její rdf (vpravo)



**Obr. 16** Rdf mezi atomy vody

atomy vzájemně odpuzují); maximum je zapříčiněno přitahováním atomu vodíku kyslíkovým atomem sousední molekuly a pevností chemické vazby kyslík – vodík v rámci molekuly.

Z radiální distribuční funkce je možno určit i střední počet atomů jiného typu v solvatačních vrstvách

$$N_j = \int_0^R g_{ij}(r) \rho_j 4\pi r^2 dr, \quad (24)$$

kde  $R$  udává poloměr solvatační vrstvy (standardně brán jako poloha následujícího minima). Pro uvedený případ vody lze takto zjistit, že ve vzdálenosti  $r < 2,4$  Å se vyskytuje cca 0,92 kyslíkových atomů (tzn. zhruba jedna molekula vody), zatímco ve vzdálenosti  $r < 3,3$  Å od kyslíkového atomu jsou v průměru 3,8 kyslíkových atomů sousedních molekul [34].

## 2.6.2 Molekulární modelování hyaluronanu ve vodném prostředí

Od počátku devadesátých let byla struktura a solvatace fragmentů HA-Na studována pomocí výpočetních technik na rozdílných úrovních v celé sérii prací. Poměrně podrobně se různí autoři zabývali flexibilitou glykosidických spojení, zejména vlivem intramolekulárních vodíkových vazeb a vodíkových vazeb zprostředkovaných molekulami rozpouštědla. Použití různých silových polí vede ke kvalitativně shodným výsledkům. Díky kvantitativním rozdílům v energetických mapách získaných pomocí rozdílných silových polí (či s explicitním vs. implicitním solventem), predikce rozměrů klubka HA-Na se může lišit v řádech desítek procent (Bethe a kol. vs. Furlan a kol. vs. Almond a kol.). Zainteresovaní autoři však téměř vždy zdůrazňují skutečnost, že vliv ostatních faktorů (iontová síla, teplota, interakce mezi klubky) může mít na strukturu větší vliv, než jsou rozdíly mezi jednotlivými modely. Struktura solvatačních vrstev kolem jednotlivých skupin byla popsána pomocí formalismu radiálních distribučních funkcí pouze v pracích Kaufmanna a kol. Ostatní autoři se spokojí s určením vodíkových vazeb mezi jednotlivými skupinami navzájem příp. mezi skupinami a molekulami vody, k čemuž používají standardní geometrická kritéria.

Holmbeck se spolupracovníky [35] jako první použili atomistické simulace jako doplněk NMR experimentů při studiu HA-Na. Zaměřili se na analýzu konformací v okolí glykosidických vazeb. Autoři zjistili, že flexibilita jednotlivých spojů (GlcA-(1,3)-GlcNAc a GlcNAc-(1,4)-GlcA) je rozdílná a závisí dokonce i na zvolené výpočetní metodě.

Kaufmann se spoluautory [36–38] prováděli MD simulace oligomerů HA-Na (AU, UA, AUA a UAU) a chondroitinsulfátu s explicitní vodou (490 molekul). Vedle flexibility glykosidických spojů sledovali uspořádání molekul vody v okolí jednotlivých skupin a tvorbu a dynamiku vodíkových vazeb. Autoři zjistili, že na jednu sacharidickou jednotku připadá 10–15 molekul vody vázaných vodíkovou vazbou.

Almond se svými spolupracovníky [39–42] se systematicky věnují studiu struktury a konformace HA-Na, zejména vlivem vodíkových vazeb na flexibilitu glykosidických spojů. Při studiu kombinují molekulárně dynamické simulace s NMR technikami ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ ). Autoři zjistili, že ke stabilizaci jednotlivých struktur přispívají jak intramolekulární vodíkové vazby (zejm. mezi vodíkem N-acetyl-D-glukosaminové skupiny a karboxylem a mezi kyslíkovými atomy v pyranosovém kruhu a blízkými hydroxylovými skupinami), tak vodíkové vazby zprostředkované molekulami rozpouštědla (zejm. opět mezi N-acetyl-D-glukosaminovou skupinou a karboxylem). Na základě populací jednotlivých torzních úhlů v okolí glykosidických vazeb pak byly navrženy pravděpodobné sekundární struktury, z nichž nejstabilnější se jeví levotočivá šroubovice obsahující 3–4 disacharidické jednotky na závit délky kolem 1 nm (obdobná nejpobouvanější struktura identifikovaná v RTG spektrech vláken HA-Na) [43]. Široká paleta možných vodíkových vazeb však vede i k jiným strukturám, často v závislosti na dalších podmínkách, kterými jsou teplota či protioity, které se uplatňují např. při ohybech řetězce.

K obdobným závěrům dospěl i Cesaro se svými spolupracovníky [44–47]. Nad to se autoři zabývají i statistikou klubek HA-Na ve vodných roztocích (vzdálenost konců, expanzní poměr, gyrační poloměr, perzistenční délka) a jimi získané výsledky se řádově shodují s experimentálními.

Obdobné vlastnosti studoval i Bathe se spoluautory pomocí zjednodušeného „coarse-grained“ modelu [48, 49] a navíc použili model k interpretaci acidobazického chování vybraných glykosaminoglykanů (chondroitin, chondroitinsulfáty a hyaluronát). Rozdíly v geometrických parametrech v porovnání s experimentálními hodnotami se pohybují do 20 %, stejně tak jako závislost směrnic titračních křivek na iontové síle. Model byl použit pro polymery o hmotnosti až do 130 kDa.

Hargittai a Hargittai [50] ve svém přehledovém článku shrnují výsledky výzkumu sekundární a terciární struktury HA-Na avšak zejména v tuhé fázi. Výsledky molekulárního modelování zmiňují pouze okrajově zejména proto, že tyto nejsou často zaměřené na koncentrované roztoky či tuhou fázi.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Reologie

##### 3.1.1 Použité chemikálie a přístroje

###### 3.1.1.1 Chemikálie

- Sodná sůl karboxymethylcelulózy (Aldrich Chemical Company, Inc.),
  - stupeň substituce: 0,9; číslo šarže: 14022 CI
  - molekulová hmotnost: 700 kDa
- Chlorid sodný, NaCl (Merci)
- Chlorid vápenatý, CaCl<sub>2</sub> (Lach:ner), číslo šarže: PP/2008/02033/0
- 35% kyselina chlorovodíková, HCl (Penta), číslo šarže 1402230209
- Destilovaná voda

###### 3.1.1.2 Přístroje a pomůcky

- Rotační reometr AR-G2 (TA Instruments),
  - geometrie: systém kužel-deska (40 mm, 1°; 60 mm, 1°)
- pH metr S20 SevenEasy™, Mettler Toledo
- Termogravimetr Universal V4.5A (TA Instruments)
- Dialyzační membrána z regenerované celulózy Spectra/Por®, velikost ok 1000 Da
- Analytické váhy Scaltec, SPB 32
- Elektromagnetická míchačka H+P Labortechnik Variomag Poly 15
- Sušárna s nastavitelnou teplotou Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

###### 3.1.1.3 Použitý software

- Rheology Advantage® Instrument Control AR, product version V5.2.0 (TA Instruments)
- TA Data Analysis
- Microsoft® Office 2003

#### 3.1.2 Metody

V rámci diplomové práce bylo studováno reologické chování roztoků sodné soli karboxymethylcelulózy (CMC-Na) o různých hmotnostních koncentracích. Mimo to bylo provedeno srovnání s roztoky protonizované formy CMC-H. U těchto vzorků byla měřena zdánlivá viskozita i jiné reologické parametry.

Cílem bylo připravit sérii roztoků CMC-Na s přidavkem vybraných iontů. Bylo sledováno, do jaké míry je reologické chování roztoků tohoto polyelektrolytu ovlivněno Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> ionty, případně zda vápenaté ionty jsou schopny propojovat řetězce CMC-Na a podporovat elastické chování (způsobovat tvorbu gelu). Experimentální část zahrnovala reologická měření a měření pH roztoků.

### 3.1.2.1 Sodná sůl karboxymethylcelulózy v prostředí elektrolytů

V případě CMC-Na byly připravovány tři základní řady roztoků. V každé řadě byla zvolena koncentrační posloupnost v rozsahu pěti hmotnostních koncentrací CMC-Na, do nichž byly přidávány různé druhy elektrolytů, přičemž shodně pro všechny elektrolyty byla zvolena iontová síla  $I = 0,1\text{M}$ . Aby mohly být sledovány vlivy jednomocných a dvojmocných iontů, byly proto jako elektrolyty vybrány chlorid sodný a chlorid vápenatý. Pro srovnání vlivu jednotlivých iontů byly také proměřeny roztoky sodné soli karboxymethylcelulózy připravené v destilované vodě (bez přídavku jakéhokoli elektrolytu).

#### Typy připravených řad

- CMC-Na bez přídavku elektrolytu
- CMC-Na + NaCl o iontové síle 0,1M
- CMC-Na + CaCl<sub>2</sub> o iontové síle 0,1M

Další dvě série tvořily vzorky, u kterých byla hlouběji proměřena 0,5% hm. a 1% hm. koncentrace CMC-Na v závislosti na různě koncentrovaných elektrolytech CaCl<sub>2</sub>. Jedná se o doplnění původní řady CaCl<sub>2</sub> o  $I = 0,1\text{M}$ .

- 0,5% CMC-Na + CaCl<sub>2</sub> o iontové síle 0,05; 0,2; 0,5; 1M
- 1% CMC-Na + CaCl<sub>2</sub> o iontové síle 0,2; 0,5; 1; 2M

Karboxymethylcelulóza je polyelektrolyt, který do jisté míry disociuje, což ovlivňuje iontová síla. Z toho důvodu byla každá koncentrace přidávaného elektrolytu přepočítána na konstantní hodnotu iontové síly roztoku (Tabulka 1).

Koncentrace elektrolytu pro zachování iontové síly byla počítána podle rovnice (25)

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i \cdot z_i^2 . \quad (25)$$

**Tabulka 1** Koncentrace elektrolytů podle konstantní hodnoty iontové síly roztoků

Označení	Iontová síla roztoku	$c_{\text{NaCl}}, \text{mol.l}^{-1}$	$c_{\text{CaCl}_2}, \text{mol.l}^{-1}$
A	0,10M NaCl	0,1	-
a	0,05M CaCl <sub>2</sub>	-	0,0167
B = b	0,10M CaCl <sub>2</sub>	-	0,0333
c	0,20M CaCl <sub>2</sub>	-	0,0667
d	0,50M CaCl <sub>2</sub>	-	0,1667
e	1M CaCl <sub>2</sub>	-	0,3333
f	2M CaCl <sub>2</sub>	-	0,6667

Při přípravě roztoku obsahující CMC-Na s přídavkem elektrolytu má vliv na viskozitu pořadí přidávaného disperzního podílu do vody [15]. Proto byl nejdříve rozpuštěn příslušný chlorid a ten byl následně přidán k CMC-Na. Celkový objem připravených roztoků byl 25 ml. Takovým způsobem byly připraveny roztoky CMC-Na o hmotnostní koncentraci 2%; 1,5%; 1%; 0,5% a 0,25%. Vzorky byly dále umístěny na elektromagnetickou míchačku, kde byly při úhlové rychlosti 400 otáček.min<sup>-1</sup> míchány 24 hodin. Následně byly vzorky uskladněny v lednici při 4 °C, kde byly ponechány další tři dny do reologického měření.

Pro vyjádření množství karboxylových skupin polyelektrolytu a protiiontů byly počítány molární poměry podle vztahu (26)

$$\frac{m_A}{M_A} = c_B \cdot V, \quad (26)$$

kde  $m_A$  a  $M_A$  odpovídá karboxylovým skupinám (násobeno stupněm substituce 0,9),  $c_B$  je koncentrace přidávaného elektrolytu a  $V$  je celkový objem roztoku.

### 3.1.2.2 Protonizovaná forma karboxymethylcelulózy

Pro úplné odstranění sodných iontů z polyelektrolytu je zapotřebí určit bod ekvivalence, který byl vypočítán ze stupně substituce. Pro CMC-Na o molekulové hmotnosti 700 kDa je stupeň substituce 0,9. Tzn., že 90 % molekuly tvoří modifikovaná CMC-Na v přítomnosti sodných iontů ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5\text{CH}_2\text{COONa}$ ,  $M = 242,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a 10 % představuje celulóza bez nahrazených hydroxylových skupin ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,  $M = 162,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Pomocí střední molekulové hmotnosti CMC-Na ( $\bar{M} = 234,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) bylo vypočítáno, že tato molekula obsahuje 2990 jednotek, z nichž 2691 je substituováno karboxymethylovými skupinami. Pro neutralizaci 1 g modifikovaných jednotek bylo potřeba přidat 38,4 ml 0,1M HCl.

Na analytických vahách bylo naváženo 8,11 g CMC-Na. Poté byla tato navážka za stálého míchání přidána do 311 ml roztoku HCl o  $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzorek byl při úhlové rychlosti 500 otáček. $\text{min}^{-1}$  míchán  $\sim 2$  hod. Touto neutralizací byl připraven 2,5% hm. roztok protonizované CMC-H. Následně byl objem přemístěn do dialyzační membrány a ponořen do nádoby s destilovanou vodou, která byla pravidelně každý druhý den vyměňována po dobu jednoho týdne. Dialýza tak umožnila odstranit nízkomolekulární produkt neutralizace NaCl.

Vzhledem k propustnosti dialyzační membrány pro molekuly vody došlo však ke snížení obsahu CMC-H v roztoku. Pomocí termogravimetrické metody bylo stanoveno, že po ukončení dialyzačního procesu se hmotnostní koncentrace dané látky snížila na 1,49 % hm. Z tohoto roztoku byla dále připravena 1% hm. CMC-H a to naředěním 12 ml vody.

### 3.1.3 Měření reologických vlastností

Tato práce je zaměřena na studium viskoelastických vlastností, které lze dobře charakterizovat pomocí oscilačních a tokových křivek. Obecně jsou disperzní roztoky CMC-Na řazeny mezi neneutonské kapaliny a podle stupně substituce se chovají jako pseudoplastické soustavy.

Měření probíhalo na rotačním reometru AR-G2 (Obr. 17) při konstantní teplotě 25 °C. Pro všechny vzorky byla využívána geometrie kužel-deska o dvou průměrech kužele. Užší průměr (40 mm, 1°) byl aplikován na více viskózní vzorky, naproti tomu širší průměr (60 mm, 1°) na kapalnější vzorky.

Nejprve byla na přístroji nastavena měřicí poloha. Poté byl do středu spodní desky nanesen vzorek o objemu 7–10 ml. Před samotným měřením bylo nutné naplnit zásobník pro rozpouštědlo destilovanou vodou. Po nastavení senzoru do měřicí polohy bylo přebytečné množství vzorku očištěno. Nakonec byl senzor zakryt ochrannými krytkami („solvent trap“), které zabraňují vysychání na okraji vzorku vytvořením vlhké atmosféry v okolí materiálu. V opačném případě by odpaření vedlo ke zvýšení viskozity. Poté bylo provedeno nastavení

přístroje pomocí softwaru *Rheology Advantage Instrument Control AR* pro měření reologických vlastností.

Pro každý typ vzorku byl nejprve proveden „ramp test“, který určuje rozsah smykového napětí, v němž probíhá měření. Tento interval je dále potřebný pro rotační test, aby měření viskozity bylo korektní. Smyková rychlost byla nastavena na  $0,1\text{--}1000\text{ s}^{-1}$ .

Dále byl při konstantní frekvenci 1 Hz proveden amplitudový test zvaný „strain sweep“, určující lineární vyjádření oscilačního měření. Při oscilačním testu byl nastaven rozsah frekvencí pro všechny vzorky v rozmezí  $20\text{--}0,01\text{ Hz}$ . Pomocí oscilací bylo určováno nakolik je vzorek tuhá látka a nakolik kapalina. Byly tedy měřeny závislosti viskózního a elastického modulu a ztrátového úhlu na frekvenci.



**Obr. 17** Rotační reometr AR-G2

Nakonec byla měřena toková křivka závislosti viskozity na smykové rychlosti, pro jejíž měření byl použit rozsah napětí získaný z „rampy“. Maximální doba pro měření jednoho bodu byla nastavena na 3 minuty. Doba temperace na 5 minut.

U některých měření byl také využit kombinovaný test, který zahrnoval dohromady oscilační i rotační test, mezi nimiž byla nastavena doba temperace na 10 minut. Ten byl použit z důvodu materiálové a časové úspory.

Pro jednotlivé testy musel být vzorek vždy vyměňován z důvodu jeho deformovatelnosti v průběhu měření.

Získaná data byla zpracována pomocí software *TA Data Analysis*, z něhož byly exportovány do Excelu. Ze sestavených grafických závislostí, bylo možné určit charakter vzorku a tím i jeho vlastnosti ovlivněné koncentrací, ať už disperzního podílu či prostředí.

### 3.1.4 Měření hodnot pH



**Obr. 18** pH metr S20 SevenEasy<sup>TM</sup>

Pro zjištění hodnot pH je možné použití indikátorových papírků, které je však pouze orientační. Z toho důvodu byl k měření využit pH-metr Mettler Toledo (Obr. 18).

Do roztoku vzorku vytemperovaného na  $25\text{ °C}$  byla ponořena měřící elektroda přístroje, na jehož displeji byly odečítány hodnoty pH. Následně byla elektroda očištěna a omyta v destilované vodě.

### 3.1.5 Statistické vyhodnocení dat

Všechna měření oscilačních a rotačních testů byla vždy nejméně jednou opakována. Jednotlivé závislosti oscilačních a tokových křivek jsou aritmetickým průměrem ze všech jejich měření. Výsledky opakovaných měření se neliší o více než 10 %.

Hodnoty pH byly měřeny pouze jednou. Jsou uvedeny v Tabulkách 15, 16.

## 3.2 Počítačové simulace

### 3.2.1 Software

- Tinker 4.2
- ChemSketch
- OpenBabel 2.1.1
- WordPad
- Microsoft® Office 2003

### 3.2.2 Molekulové modelování

V rámci části zaměřené na molekulové modelování bylo provést molekulárně dynamické simulace tetrameru hyaluronanu sodného (HA-Na) a vápenatého (HA-Ca) pomocí programového balíku Tinker (tetramer představuje 4 stavební dvojjednotky, tzn. 8 substituovaných glukózových zbytků). Simulované fragmenty byly obklopeny molekulami vody a následně byla prováděna molekulová dynamika při teplotě 300 K, tlaku 1 Bar a kroku 0,5 ns. Z nasimulovaných trajektorií byla sledována zejména struktura a uspořádání molekul vody v okolí jednotlivých skupin a sodných a vápenatých iontů.

První experiment tvořil tetramer hyaluronanu sodného v prostředí ~ 1600 molekul vody. Systém byl tedy tvořen ~ 5000 atomy HA-Na a vody v přítomnosti čtyř sodných kationtů vlastní soli. Dalším z prováděných pokusů byl tetramer hyaluronanu vápenatého v témže prostředí jako u sodné soli. Avšak z valenčních důvodů byly přítomny pouze 2 vápenaté kationty.

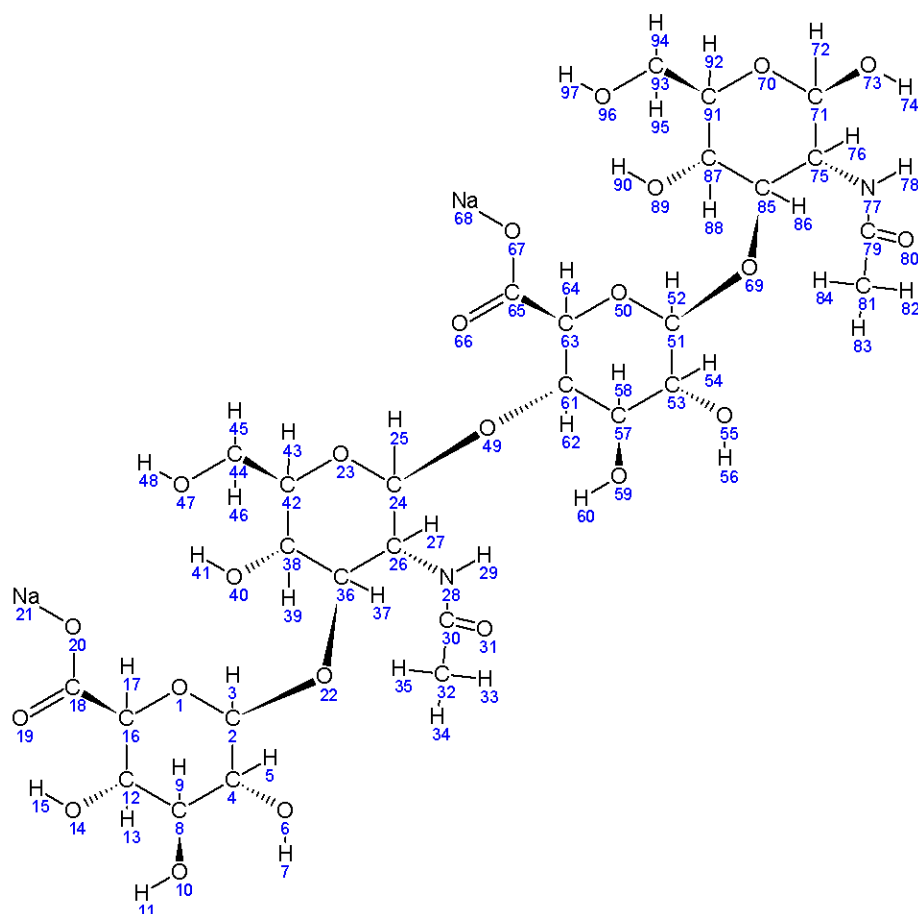
Nejdříve byla vytvořena struktura ve formátu „MDL molfile“ pomocí programu ChemSketch (Obr. 19). Pro ilustraci je znázorněn pouze dimér HA-Na, obsahující jednotky uvnitř řetězce a zároveň jednotky uzavírající řetězec. Atomy byly očíslovány. Pomocí programu OpenBabel byl soubor ve formátu „MDL molfile“ převeden do PDB formátu (Protein Data Bank), a to z toho důvodu, že formát MDL není programem Tinker podporován.

Pro mezimolekulární interakce bylo vybráno silové pole OPLSAA [51–56], které obsahuje potřebné parametry pro spuštění a průběh simulací. Byla to však pouze základní verze, která neobsahovala spoustu potřebných parametrů a po spuštění MD program hlásil chybu. Proto bylo silové pole rozšířeno na základě e-mailové korespondence s W. L. Jorgensenem (výrobce silového pole) o ~ 10 vazebných a 30 torzních úhlů, které nebyly zahrnuty v původní verzi.

Prostřednictvím tohoto upraveného silového pole byl x.pdb formát převeden na x.xyz formát. V textovém editoru (WordPad) byly ke každému atomu přiřazeny čísla atomů, odpovídající parametrovému souboru OPLSAA.prm (Tabulka 2–5). Typy atomů byly vybírány také podle toho, aby celkový náboj molekuly byl nulový. Náboje a ostatní parametry jsou taktéž součástí OPLSAA. Poté byl ručně vložen do systému příslušný počet molekul vody, který byl přidán k molekule HA-Na, do systému v Tinkru. Simulovaná jednotka HA-Na je znázorněna na Obr. 20 a jednotka obklopená molekulami vody na Obr. 21.

Po minimalizaci energie systému byla spuštěna MD simulace. Stejný postup byl aplikován i na tetramer HA-Ca.





**Obr. 19** Dimér hyaluronanu sodného

**Tabulka 2** Typy atomů *N*-acetyl-*D*-glukosaminu tvořící jednotky uvnitř řetězce

Pořadí atomu	Typ atomu	Tinker označení	Tinker poznámka	Náboj
23	O	39	OS „O Acetal“	-0,400
24	C	46	CO „CHRO <sub>2</sub> Acetal“	0,300
25	H	47	HC „CHRO <sub>2</sub> Acetal“	0,100
26	C	93	CT „O=CNR-CHR <sub>2</sub> Amide“	0,140
27	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
28	N	85	N „RHNC=O Amide“	-0,500
29	H	88	H „RHNC=O Amide“	0,300
30	C	82	C „NC=O Amide“	0,500
31	O	83	O „NC=O Amide“	-0,500
32	C	1	CT „RCH <sub>3</sub> Alkane“	-0,180
33	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
34	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
35	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
36	C	36	CT „R <sub>2</sub> CHOR i-Pr Ether“	0,170
37	H	38	HC „H Ether Calpha“	0,030
38	C	20	CT „CH i-Pr Alcohol“	0,205
39	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
40	O	31	OH „OH Diols“	-0,700
41	H	32	HO „HO Diols“	0,435
42	C	36	CT „R <sub>2</sub> CHOR i-Pr Ether“	0,170

43	H	38	HC „H Ether Calpha“	0,030
44	C	19	CT „CH <sub>2</sub> & CH <sub>3</sub> Alcohol“	0,145
45	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
46	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
47	O	16	OH „OH Alcohol“	-0,683
48	H	17	HO „HO Alcohol“	0,418
49	O	39	OS „O Acetal“	-0,400

**Tabulka 3** *Doplňující atomy pro jednotku N-acetyl-D-glukosaminu uzavírající řetězec*

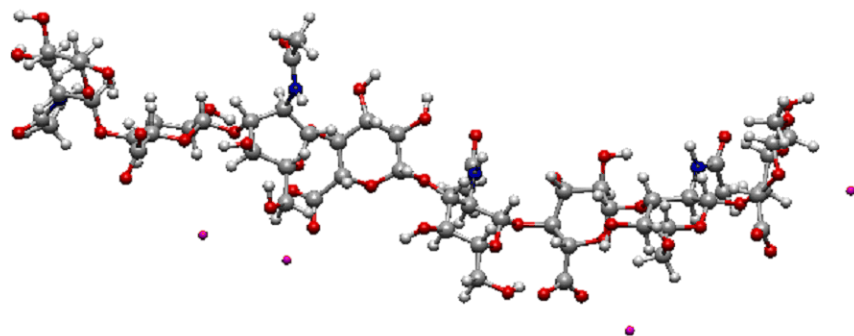
Pořadí atomu	Typ atomu	Tinker označení	Tinker poznámka	Náboj
71	C	48	CO „CHRO <sub>2</sub> Hemiacetal“	0,365
72	H	49	HC „CHRO <sub>2</sub> Hemiacetal“	0,100
73	O	40	OH „OH Hemiacetal“	-0,700
74	H	41	HO Hemiacetal	0,435

**Tabulka 4** *Typy atomů glukuronanu sodného (vápenatého) tvořící jednotky uvnitř řetězce*

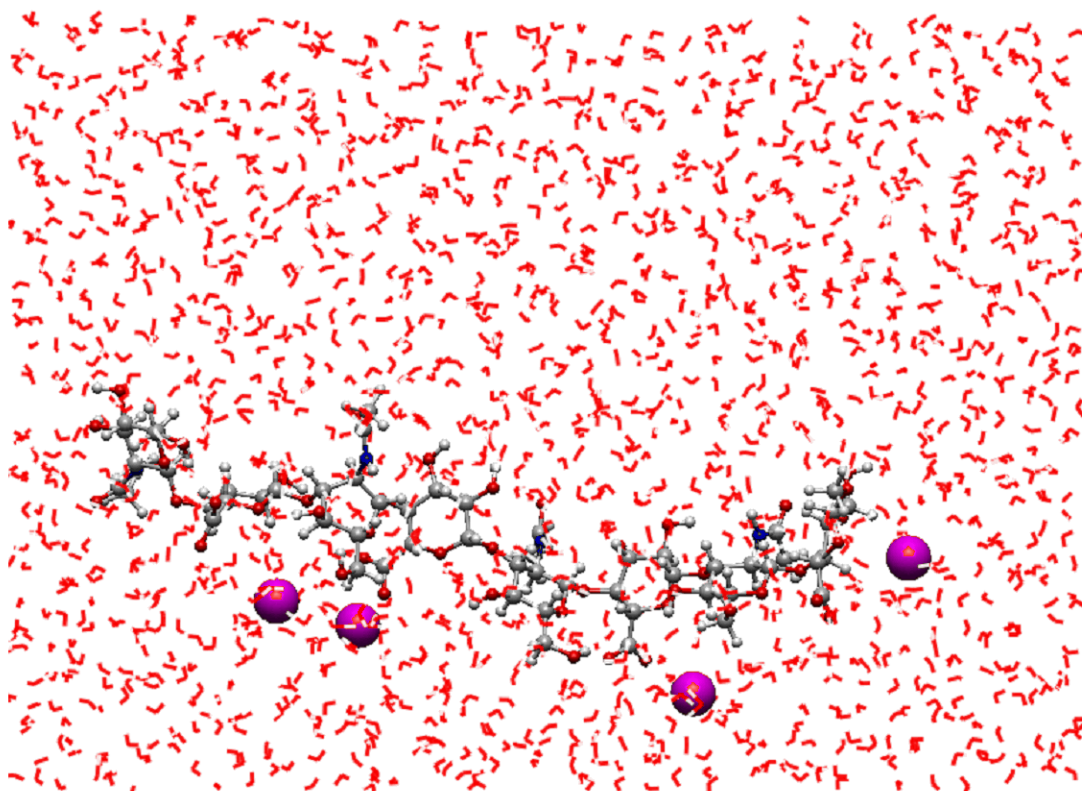
Pořadí atomu	Typ atomu	Tinker označení	Tinker poznámka	Náboj
50	O	39	OS „O Acetal“	-0,400
51	C	46	CO „CHRO <sub>2</sub> Acetal“	0,300
52	H	47	HC „CHRO <sub>2</sub> Acetal“	0,100
53	C	20	CT „CH i-Pr Alcohol“	0,205
54	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
55	O	31	OH „OH Diols“	-0,700
56	H	32	HO „HO Diols“	0,435
57	C	20	CT „CH i-Pr Alcohol“	0,205
58	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
59	O	31	OH „OH Diols“	-0,700
60	H	32	HO „HO Diols“	0,435
61	C	36	CT „R <sub>2</sub> CHOR i-Pr Ether“	0,170
62	H	38	HC „H Ether Calpha“	0,030
63	C	115b	CT „R <sub>2</sub> CHOR i-Pr Ether“	0,040
64	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
65	C	111	C „COO- Carboxylate“	0,700
66	O	112	O <sub>2</sub> „COO- Carboxylate“	-0,800
67	O	112	O <sub>2</sub> „COO- Carboxylate“	-0,800
68	Na	195	Na <sup>+</sup> „Na <sup>+</sup> Sodium Ion“	1,000
68	Ca	200	Ca <sup>+</sup> „Ca <sup>2+</sup> Calcium Ion“	2,000
69	O	39	OS „O Acetal“	-0,400

**Tabulka 5** *Doplňující atomy pro jednotku glukuronanu sodného (vápenatého) uzavírající řetězec*

Pořadí atomu	Typ atomu	Tinker označení	Tinker poznámka	Náboj
12	C	20	CT „CH i-Pr Alcohol“	0,205
13	H	6	HC „HR Alkane“	0,060
14	O	31	OH „OH Diols“	-0,700
15	H	32	HO „HO Diols“	0,435



**Obr. 20** Tetramer hyaluronanu sodného, Tinker zobrazení



**Obr. 21** Tetramer hyaluronanu sodného obklopený molekulami vody, Tinker zobrazení

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

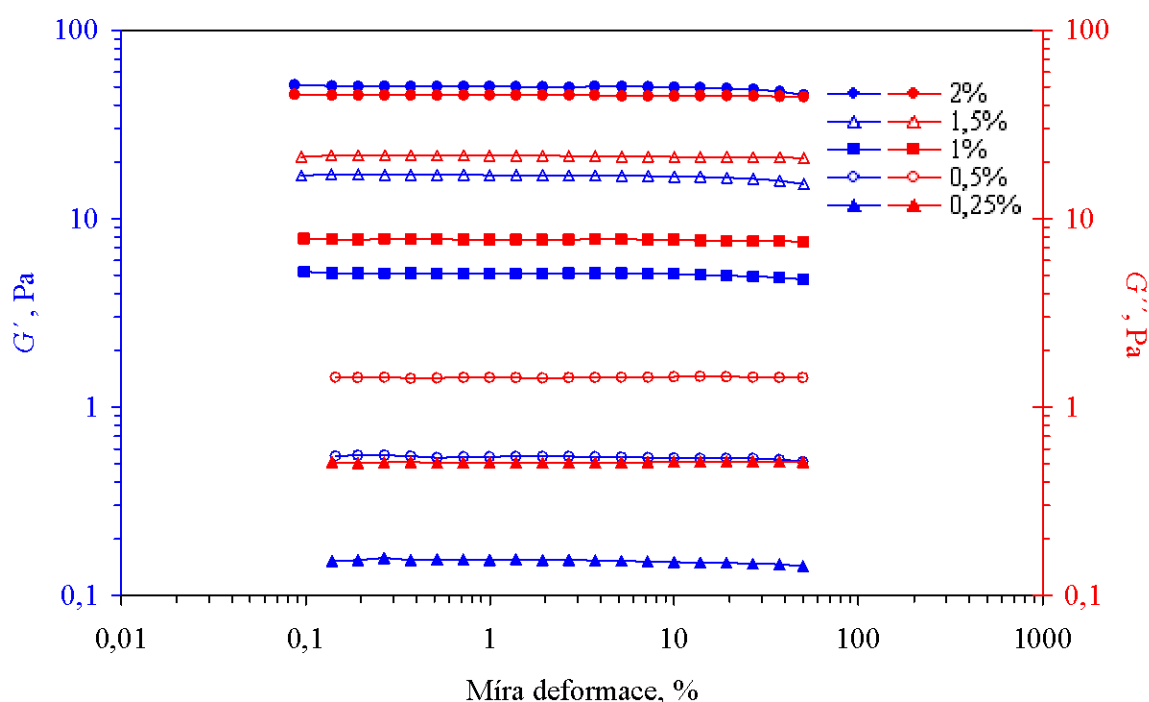
### 4.1 Reologie

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo prozkoumat reologické vlastnosti karboxymethylcelulózy sodné (CMC-Na) a její protonizované formy (CMC-H) ve vodných roztocích nebo roztocích elektrolytů. Bylo zjišťováno v přítomnosti jakých iontů a za jakých podmínek mohou dané látky síťovat, pokud vůbec. Materiály lze popsat pomocí tokových křivek, ze kterých je určována zdánlivá viskozita, anebo pomocí oscilačních měření, jež charakterizují viskoelastické vlastnosti, to znamená např. frekvenční závislosti modulů či ztrátového úhlu. Jako hlavní elektrolyty o různém mocenství byly použity NaCl a CaCl<sub>2</sub>.

Výsledky, získané následujícími měřeními, by měly objasnit průběh síťování v různých koncentracích polymerních řetězců. Jejich využití by bylo vhodné pro různé aplikace, zejména pak ve farmakologii.

#### 4.1.1 Sodná sůl karboxymethylcelulózy (CMC-Na)

Na počátku experimentů bylo nejprve nutné zjistit chování a charakteristiky (Obr. 22–25) čisté CMC-Na bez jakýchkoliv přísad elektrolytů za účelem srovnání vlivů různých iontů, které mohou působit na proces síťování.



**Obr. 22** Znáznornění závislosti pamětového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na deformaci pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přidavku elektrolytu („strain sweep test“)

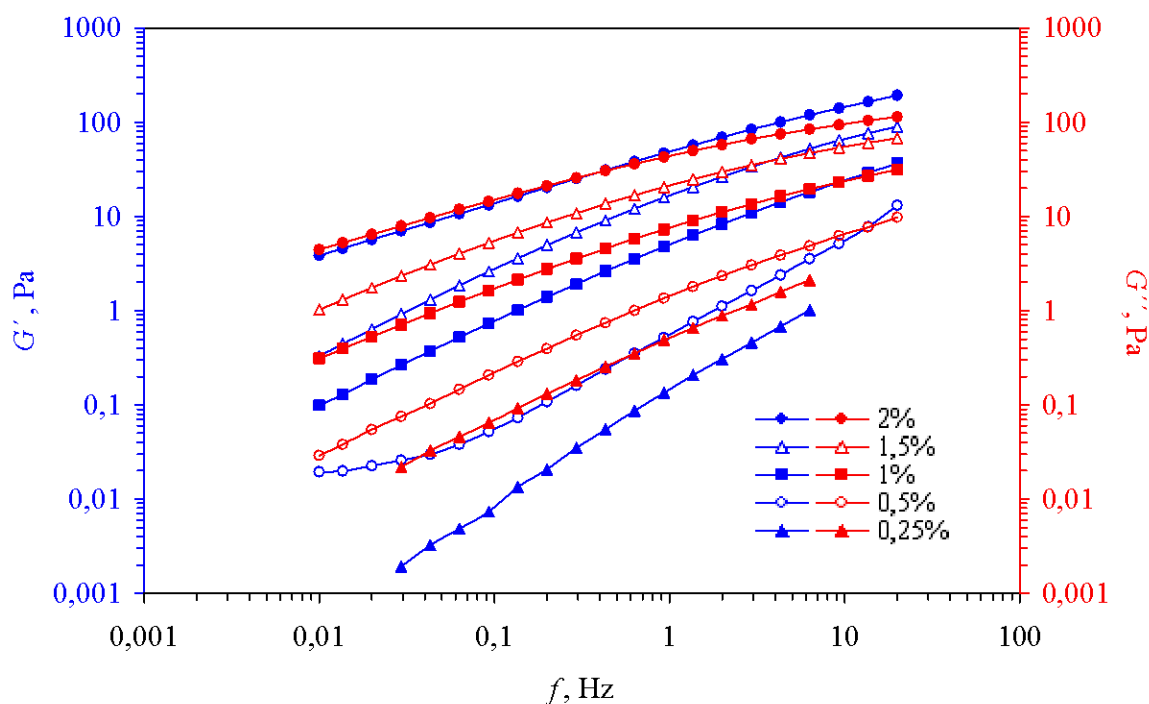
Na Obr. 22 jsou znázorněny křivky získané prostřednictvím „strain sweep testu“, pomocí něhož byla nalezena oblast lineární viskoelasticity LVE. Tento test probíhal při jedné frekvenci 1 Hz a proměnlivé deformaci. Z uvedených křivek vyplývá, že ztrátový modul  $G''$ , vypovídající o viskózním chování, převládá téměř u všech uvedených koncentrací. Výjimkou je 2% hm. vzorek, u kterého mírně převládá elastický modul  $G'$ , což odpovídá slabě

gelovitému charakteru vzorku. Se zvyšující koncentrací CMC-Na se moduly k sobě postupně přibližují, resp. roste elastický modul  $G'$ . Děje se tak z důvodu vyšší koncentrace roztoku, při které dochází k proplétání polymerních řetězců a interakcím mezi nimi, jež mají za následek zvyšování jak elasticity, tak celkové mechanické odolnosti vzorku. Z provedeného testu lze pozorovat, že v daném rozsahu amplitud moduly  $G'$  a  $G''$  nevykazují závislost na míře deformace, tudíž celé testované rozmezí amplitud představuje lineární oblast viskoelasticity. Pro testy frekvenčních charakteristik byla proto vybrána hodnota deformace 1 %.

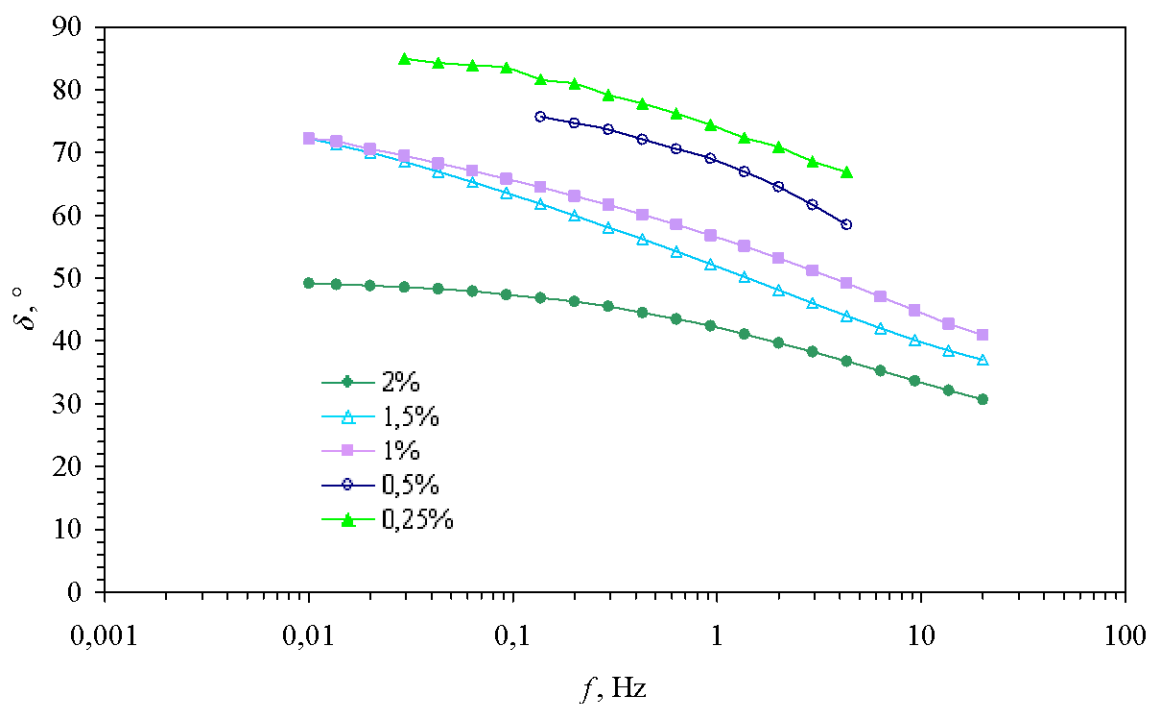
Z důvodu, že předchozí test zjistil pouze oblast LVE a měření bylo prováděno pouze při jedné frekvenci, je nutné pro posouzení celkového mechanického chování roztoku použít test frekvenční charakteristiky, tzv. „frequency sweep test“, prostřednictvím kterého jsou měřeny viskoelastické vlastnosti v rozmezí frekvencí 0,01–20 Hz (Obr. 23 a 24). Z Obr. 23 je patrné, že čím vyšší je koncentrace vzorků CMC-Na, tím nižší je frekvence, při které dochází k překřížení modulů. Takové překřížení má za následek přechod z kapaliny do podoby elastické látky. Prostřednictvím „strain sweep testu“ bylo zjištěno, že u 2% hm. vzorku převládá elastické chování, ale díky „frequency sweep testu“ bylo prokázáno, že se tak děje od oblasti středních frekvencí ( $\sim 0,5$  Hz) měřeného rozsahu.

Tento jev taktéž potvrzuje závislost ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci znázorněná na Obr. 24, která určuje charakter vzorku, tedy převládá-li elastické či viskózní chování. Určující hodnotou je  $45^\circ$  (viz část 2.5.3.4), kde úsek křivky zasahující pod tuto mez naznačuje elastické chování vzorku.

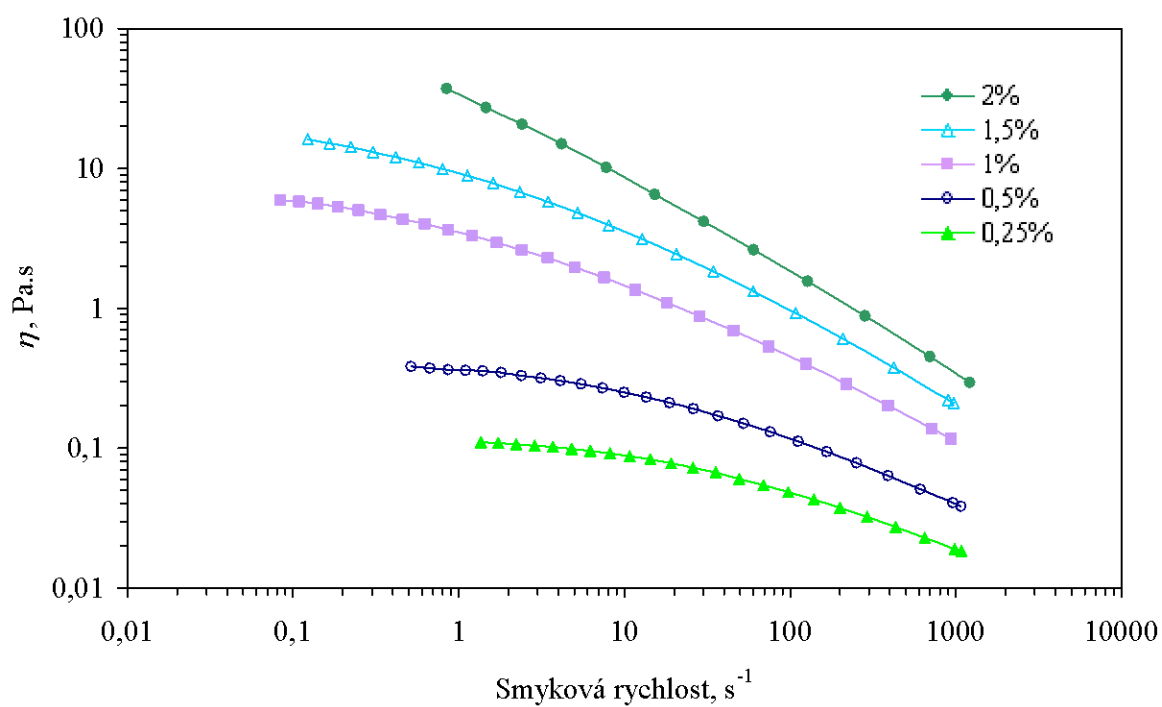
Z Obr. 23 je dále možno vyhodnotit celkovou mechanickou odolnost vzorků pomocí obou modulů  $G'$  a  $G''$ , z jejichž příspěvků je tvořen komplexní modul  $G^*$  (viz část 2.5.3.4.). Je názorně vidět, že se vzrůstající koncentrací CMC-Na rostou rovněž oba zmíněné moduly daných roztoků, tzn. nejkonzentrovanejší vzorek je mechanicky nejodolnější.



**Obr. 23** Graf závislosti pamětového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přídavku elektrolytu („frequency sweep test“)



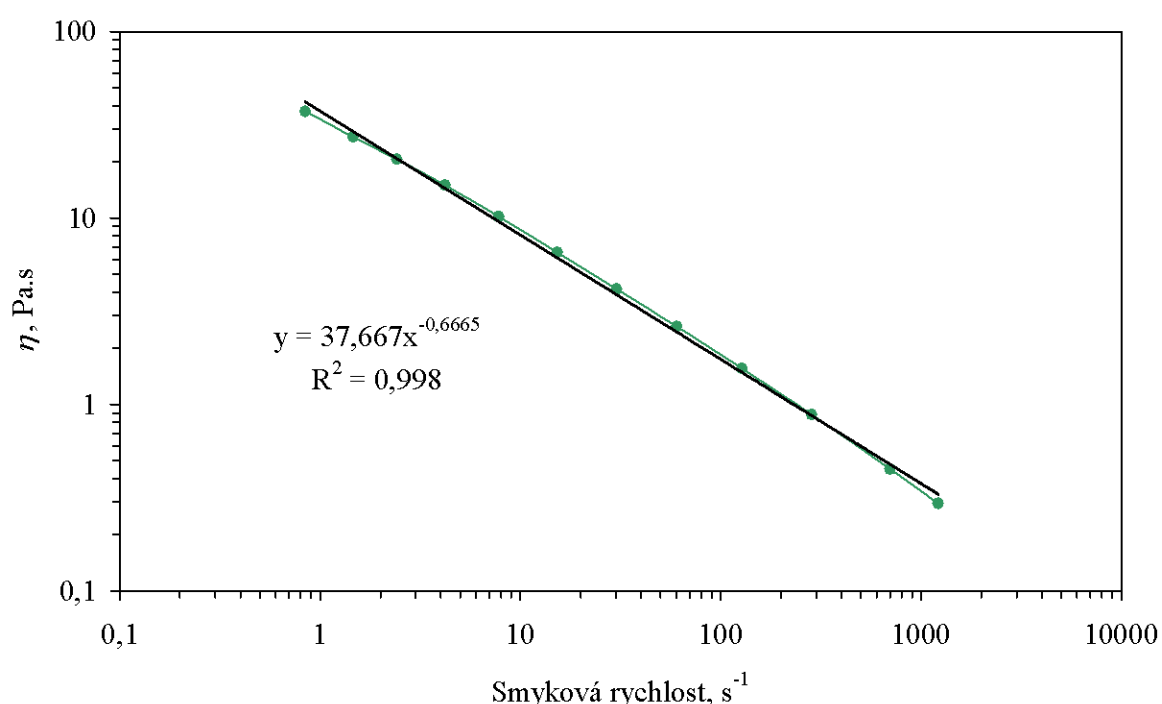
**Obr. 24** Znáznornění závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přidavku elektrolytu („frequency sweep test“)



**Obr. 25** Znáznornění závislosti viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přidavku elektrolytu („steady state“)

Na Obr. 25 jsou znázorněny tokové křivky roztoků v různých koncentracích CMC-Na. Z naměřených závislostí viskozity na smykové rychlosti je patrné, že se vzrůstajícím rychlostním gradientem viskozita klesá. Tento jev je znám jako pseudoplastičita. Z tokových křivek je také jasně vidět, že viskozita CMC-Na vzrůstá s její koncentrací v roztoku. Tato závislost je způsobena větším množstvím polymerních řetězců v objemové jednotce a zvýšenou mírou jejich vzájemného proplétání.

Míra pseudoplastičity je určována pomocí indexu toku  $n$ . Proložení tokových křivek mocninnou funkcí byl získán index toku každého vzorku podle vztahu (7). Na Obr. 26 je znázorněna ukázka pro 2% hm. CMC-Na. V rovnici regrese exponent odpovídá  $n-1$ , z něhož byla dopočítána hodnota indexu toku. Tato hodnota vyjadřuje míru nenewtonského chování (Tabulka 6). Výsledky poukazují na snižování daného indexu při zvyšování koncentrace CMC-Na, což nasvědčuje nárůstu pseudoplastického chování.



**Obr. 26** Ukázka proložení závislosti zdánlivé viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pomocí mocninné funkce pro 2% hm. roztok CMC-Na bez přídavku

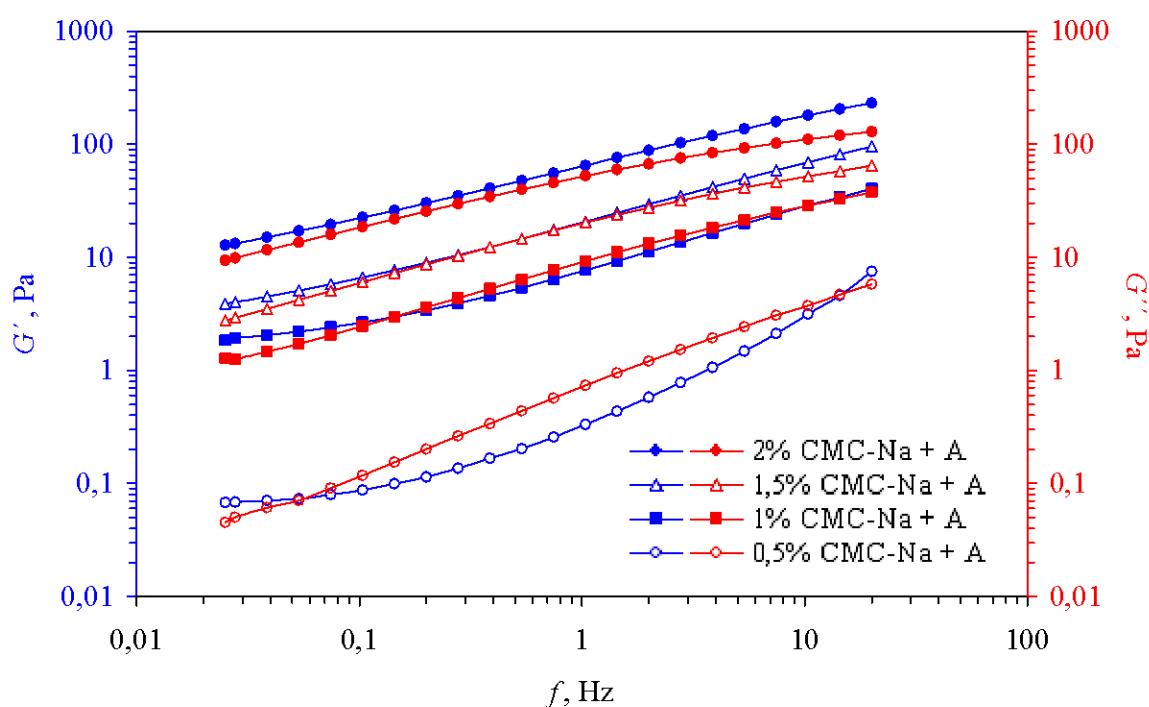
**Tabulka 6** Hodnoty indexu toků pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přídavku

w CMC-Na, % hm.	Index toku $n$
2	0,334
1,50	0,513
1	0,577
0,50	0,697
0,25	0,728

#### 4.1.1.1 CMC-Na s přidavkem NaCl ( $I = 0,1M$ )

Další sekci tvoří studium reologického chování CMC-Na v roztocích obsahujících NaCl ( $I = 0,1M$ ) v závislosti na různé koncentraci CMC-Na. Na Obr. 27 a 28 jsou znázorněny oscilační závislosti pouze pro čtyři koncentrace CMC-Na. Vzorek o koncentraci 0,25% hm. nebyl měřen z důvodu jeho nevhodné konzistence.

Z oscilačních výsledků získaných pomocí „frequency sweep testu“ (Obr. 27) je vidět, podobně jako v případě čisté CMC-Na bez přidavku, téměř stejný trend. To znamená, že se vzrůstající koncentrací CMC-Na postupně vzrůstá modul  $G'$  oproti  $G''$  a zároveň roste celková mechanická odolnost vzorků. Na rozdíl od CMC-Na v čisté vodě dochází v přítomnosti NaCl k prohloubení elastických vlastností již při nižší koncentraci (1,5% hm.). U vzorků o koncentraci 2% hm. a 1,5% hm. převládá elastický modul  $G'$  nad viskózním  $G''$  v celém rozsahu frekvencí, což naznačuje slabě gelovitou strukturu vzorku. Vzorek o koncentraci 1% hm. vykazuje převládající elastické chování pouze v nízkých frekvencích ( $< 0,1$  Hz). Naznačuje to, že sodné ionty v určitém poměru k CMC-Na přispívají k interakcím mezi jednotlivými řetězci, které vedou ke zvýšení elasticity vzorku. Křivky pro vzorek o koncentraci 0,5% hm. sice naznačují zvýšení elastického modulu  $G'$  ve velmi nízkých ( $< 0,05$  Hz) a vysokých ( $> 10$  Hz) frekvencích, což ale vzhledem k nízké mechanické odolnosti vzorku mohou být tato data ovlivněna chybou přístroje.

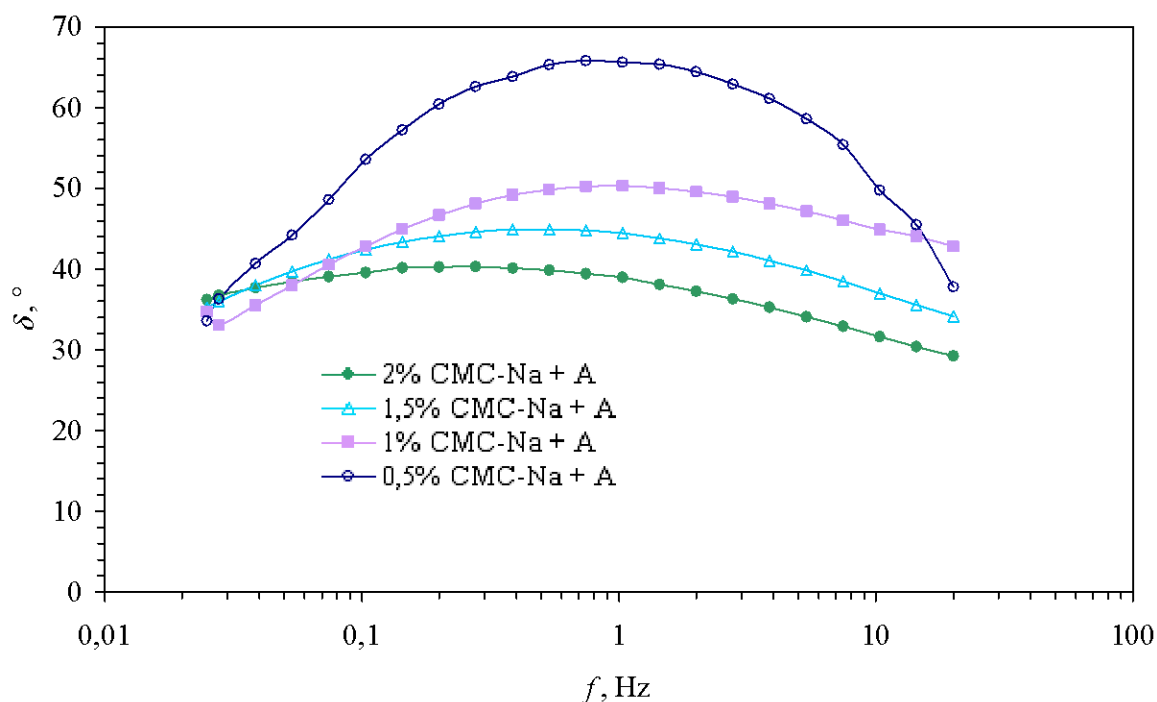


**Obr. 27** Graf závislosti pamětového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem NaCl ( $I = 0,1$ ); A – NaCl

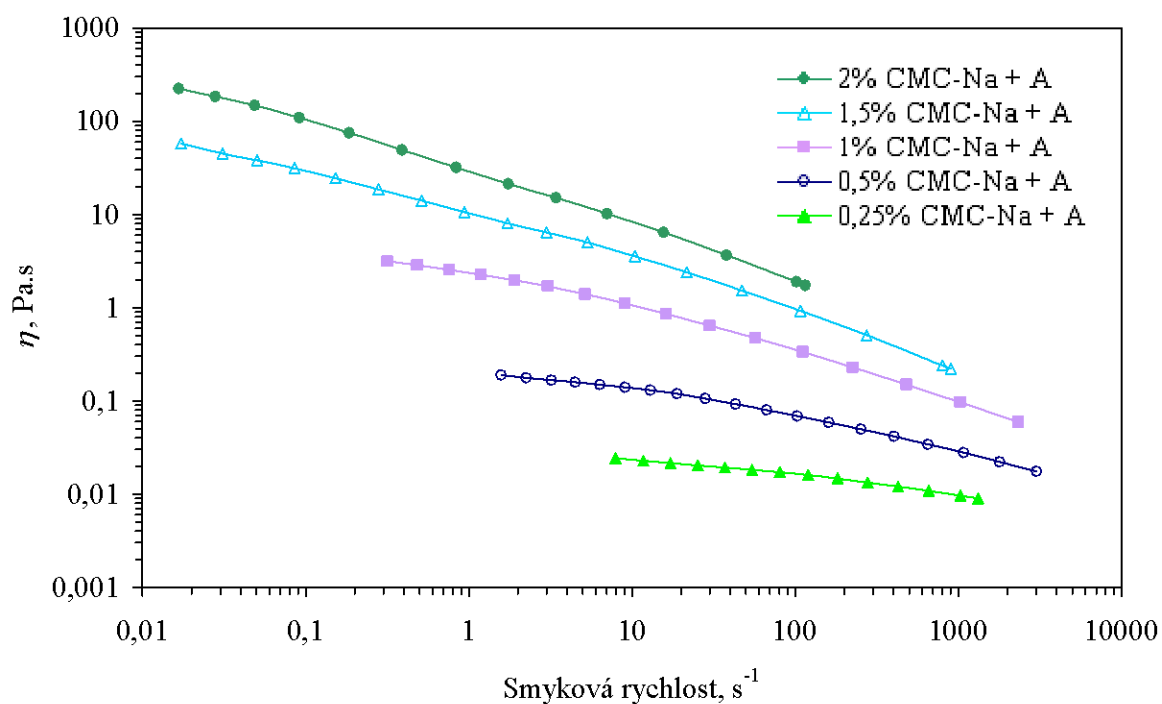
Gelovitá struktura 2% hm. a 1,5% hm. vzorku je patrná také ze závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci (Obr. 28). Na rozdíl od měření bez přidavku NaCl vykazuje 1% hm. v NaCl pokles  $\delta$  pod  $45^\circ$  při frekvencích pod 0,5 Hz a nad 5 Hz a tedy zvýšení elastického chování a také závislost vykazuje jiný průběh než vzorek ve vodě. Průběh ztrátového úhlu pro 0,5% hm. vzorek je rozdílný od všech ostatních vzorků a je větší než  $45^\circ$  v daném rozsahu, tedy u něho



převládá viskózní charakter. Ze stejného důvodu jako u modulů  $G'$ ,  $G''$  nebyly uvažovány hodnoty  $\delta$  v nízkých a nejvyšších frekvencích.



**Obr. 28** Znáznornění závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem NaCl ( $I = 0,1M$ ); A – NaCl



**Obr. 29** Znáznornění závislosti viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem NaCl ( $I = 0,1M$ ); A – NaCl

Z tokových křivek (Obr. 29) je opět vidět, že se zvyšující se koncentrací vzrůstá také viskozita a míra nenewtonského chování, o čemž také vypovídají indexy toků uvedené v Tabulce 7. Viskozitní křivky vzorků v NaCl ( $I = 0,1M$ ) mají poněkud jiný průběh než pro vzorky v čisté vodě, kdy postupně zanikají oblasti s konstantní viskozitou v nízkých smykových rychlostech, tzv. limitní viskozita. Nejméně koncentrovaný vzorek se svým chováním blíží k indexu toku newtonské kapaliny ( $n = 1$ ).

**Tabulka 7** Hodnoty indexu toků pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přídavkem NaCl ( $I = 0,1M$ )

$w$ CMC-Na + NaCl ( $I = 0,1M$ ), % hm.	Index toku $n$
2	0,445
1,50	0,494
1	0,553
0,50	0,686
0,25	0,809

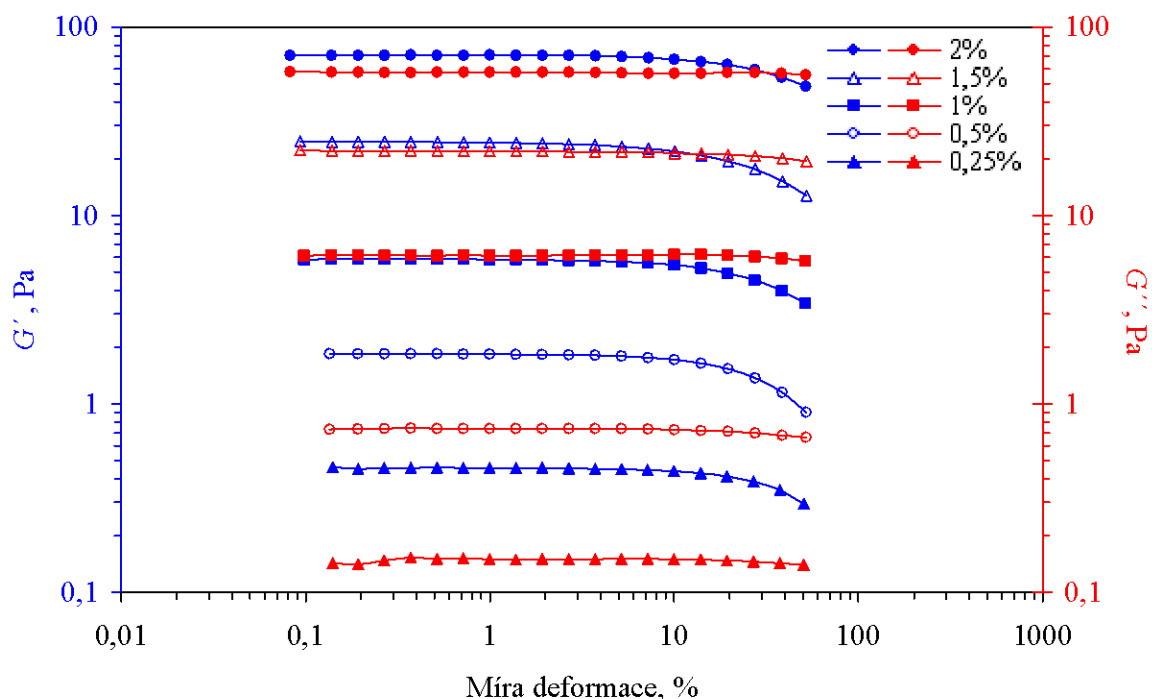
Z teoretických základů vyplývá, že sodné ionty odstiňují odpudivé elektrostatické interakce, které udržují CMC-Na ve formě nataženého řetězce. Přidáním protiiontů do roztoku CMC-Na dojde ke zvýšení iontové síly, vlivem protiiontů se sníží odpudivé elektrostatické interakce mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami, molekula se stává ohebnější a smršťuje se. Tím se zmenší hydrodynamický objem a dochází k poklesu viskozity  $\eta$ .

#### 4.1.1.2 CMC-Na s přídavkem $CaCl_2$ ( $I = 0,1M$ )

V následující kapitole je pozorován vliv  $Ca^{2+}$  iontů na reologické chování CMC-Na a jeho případné síťování vzhledem k jeho bivalentnímu charakteru, jak to ukazují např. jiné polyelektrolyty [19, 24, 57]. Předpokládá se, že dvojmocné ionty by měly na rozdíl od  $Na^+$  síťovat CMC-Na řetězce a tvořit tak gel.

Na Obr. 30 je vidět, že téměř u všech uvedených koncentrací převládá při frekvenci 1 Hz paměťový modul  $G'$  vypovídající o gelovitém charakteru vzorků. Jsou zde ale rozdíly při nízkých a vysokých koncentracích CMC-Na. Důležitou roli hraje poměr  $COO^-$  a  $Ca^{2+}$  (Tabulka 8). Nízké koncentrace CMC-Na naznačují síťování polymerních řetězců vápenatými ionty, ale pokud je koncentrace karboxylů zvýšena nad určitý kritický poměr, jak je tomu např. u 1% hm. vzorku, pak naopak dochází ke snížení elastického modulu  $G'$ . V tomto případě se moduly překrývají, čili chování vzorku je na hranici mezi viskózním a elastickým charakterem. Další zvýšení koncentrace CMC-Na ( $> 1\%$  hm.) pak způsobí opět posílení elasticity, což je ale zapříčiněno zvýšenou koncentrací polymeru než síťováním pomocí vápenatých iontů.

Z molárních poměrů uvedených v Tabulce 8 vyplývá, že kritický poměr by se mohl nacházet mezi 1,7–0,9 moly  $Ca^{2+}$  na jednu karboxylovou skupinu. Tato otázka však bude diskutována v dalších kapitolách.

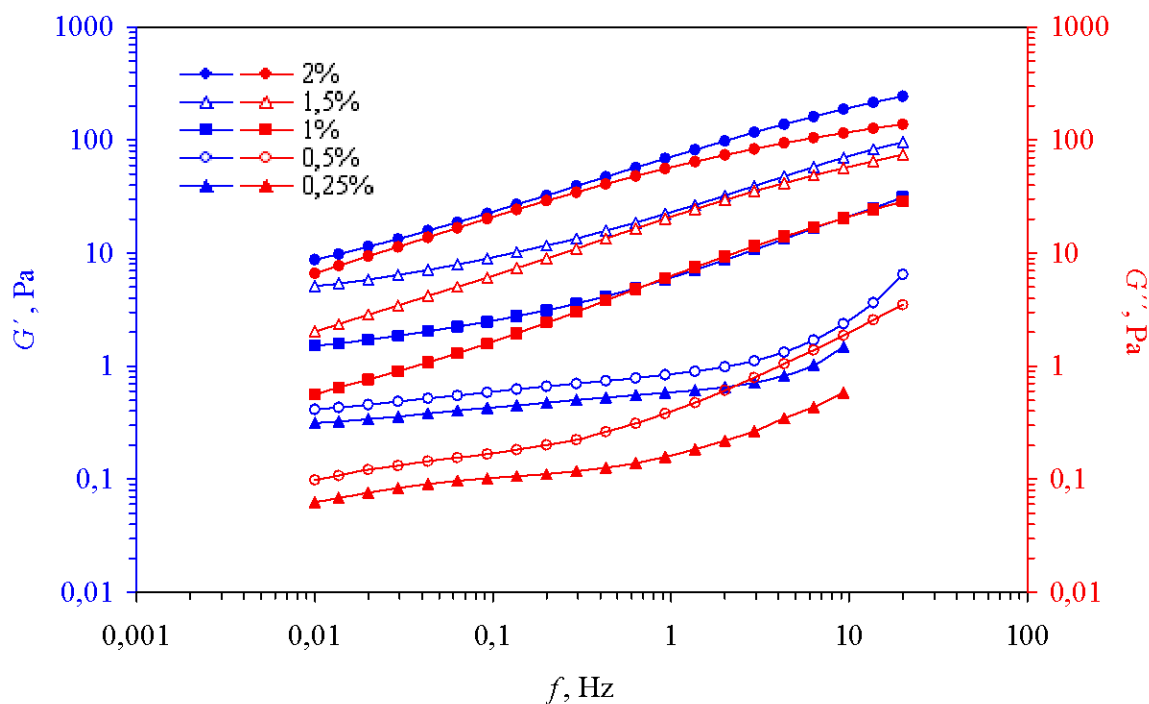


**Obr. 30** Znáznornění závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na deformaci pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ )

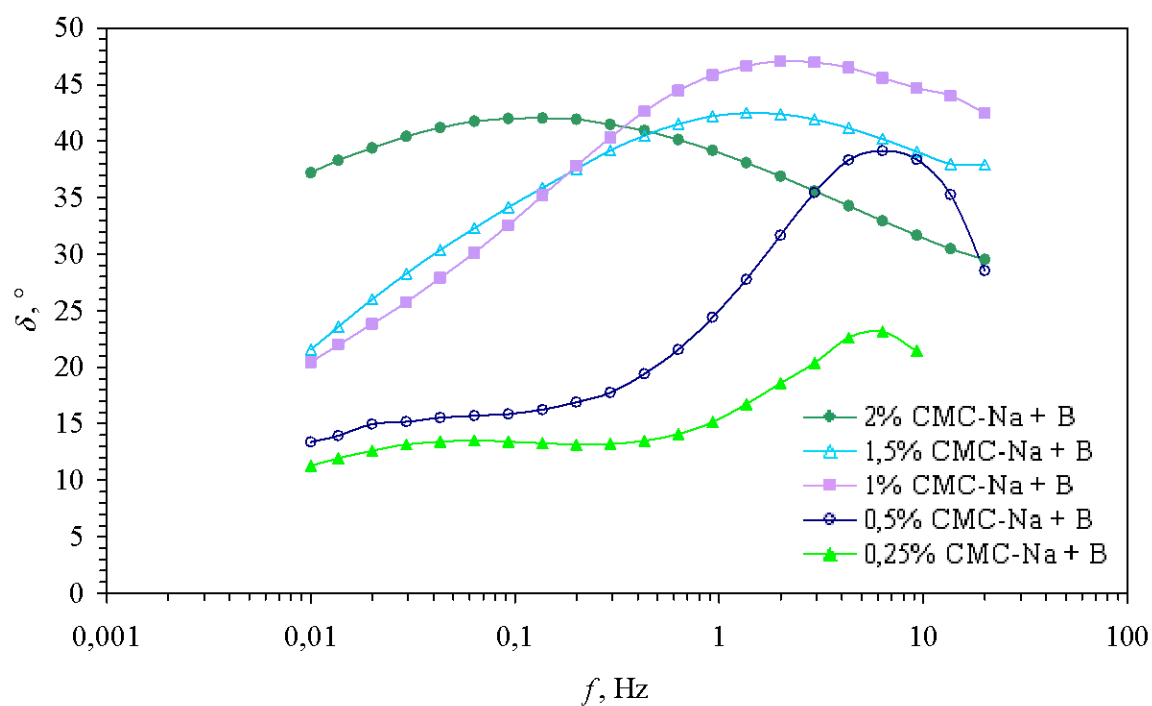
**Tabulka 8** Molární poměry iontů  $\text{COO}^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ )

$w$ CMC-Na + $\text{CaCl}_2$ ( $I = 0,1\text{M}$ ), % hm.	$\text{COO}^- : \text{Ca}^{2+}$ , mol
0,25	1 : 3,4
0,50	1 : 1,7
1	1 : 0,9
1,50	1 : 0,6
2	1 : 0,4

Z frekvenčních charakteristik je vidět, že křivky modulů (Obr. 31) a ztrátového úhlu (Obr. 32) pro různě koncentrované roztoky CMC-Na se navzájem liší. Vzorek o koncentraci 2% hm. CMC-Na je jako jediný elastičtější od vyšších frekvencí. U všech ostatních koncentrací jsou vzorky více elastické v nižších frekvencích, o čemž také vypovídají hodnoty ztrátového úhlu, které nabývají hodnot pod  $45^\circ$  (Obr. 32). Vzorek o koncentraci 1% hm. vykazuje rovněž při nízkých frekvencích zvýšenou elasticitu ( $< 1\text{ Hz}$ ), což nebylo možné pozorovat při testu „strain sweep“ (Obr. 30). Opět jako v předešlých případech se vzrůstající koncentrací CMC-Na rostou hodnoty obou modulů, čímž dochází ke zvyšování celkové mechanické odolnosti vzorků (Obr. 31).

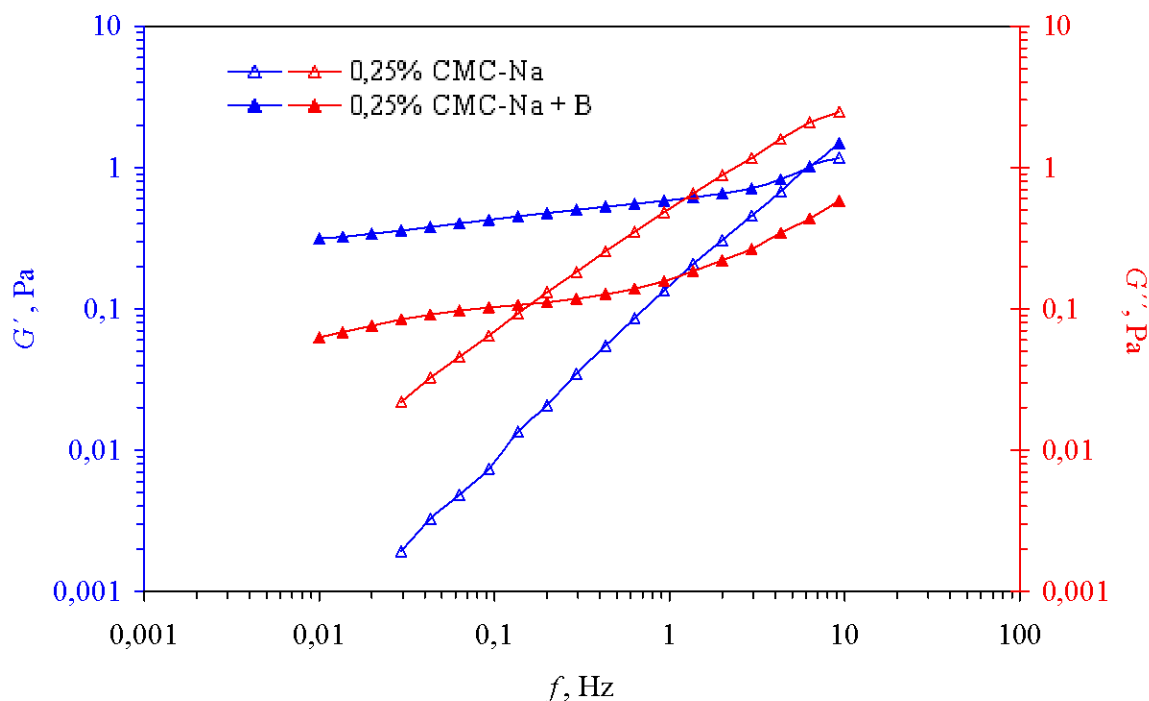


**Obr. 31** Graf závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ )



**Obr. 32** Znárodnění závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); B –  $\text{CaCl}_2$

Srovnáním různých koncentrací CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M bylo tedy zjištěno, že čím menší je koncentrace CMC-Na a čím více připadá molů vápníku na jednu karboxylovou skupinu (Tabulka 8), tím více dochází k síťování. Tento jev je však odlišný ve srovnání s CMC-Na bez přidavku elektrolytu, kde v nejnižší koncentraci (0,25% hm.) vzorek vykazuje viskózní chování. Zde můžeme pozorovat zcela odlišný charakter vzorku (Obr. 33).

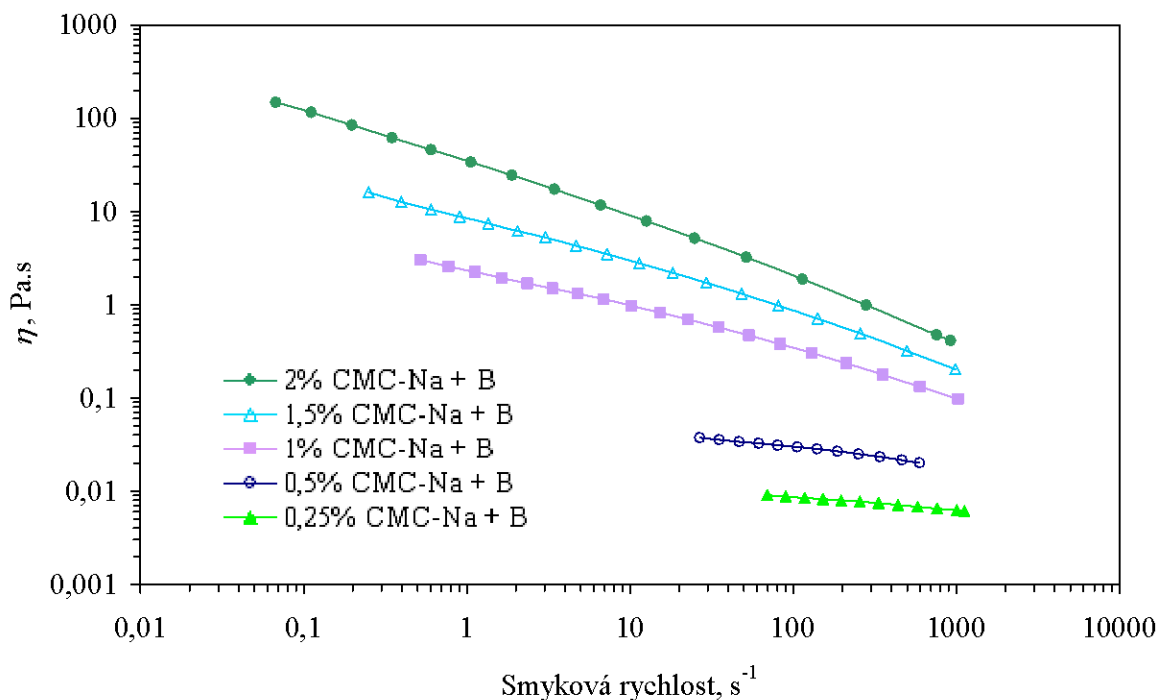


**Obr. 33** Znáznornění závislosti  $G'$  a  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro 0,25% hm. CMC-Na bez přidavku a s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; B –  $\text{CaCl}_2$

Z měřených závislostí viskozity na smykové rychlosti pro různě koncentrované roztoky CMC-Na vyplývá stejný trend, jako v předchozích případech. Tzn., že se vzrůstající koncentrací CMC-Na roste také viskozita a míra newtonského chování. Na rozdíl od roztoků, do kterých byly přidávány sodné protiionty, zde dochází v nízkých koncentracích k větší kontrakci klubka, o čemž vypovídá také index toku (Tabulka 9). Děje se tak proto, že sodné ionty pouze odstiňují odpuzivé elektrostatické interakce, avšak vápenaté ionty díky svému bivalentnímu charakteru mohou spojit dvě karboxylové skupiny.

**Tabulka 9** Hodnoty indexu toků pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M

$w$ CMC-Na + $\text{CaCl}_2$ ( $I = 0,1\text{M}$ ), % hm.	Index toku $n$
2	0,383
1,50	0,485
1	0,555
0,50	0,804
0,25	0,860



**Obr. 34** Znáznornění závislosti viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pro různě koncentrované roztoky CMC s přidavkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); B –  $\text{CaCl}_2$

#### 4.1.2 Protonizovaná forma (CMC-H) původní soli

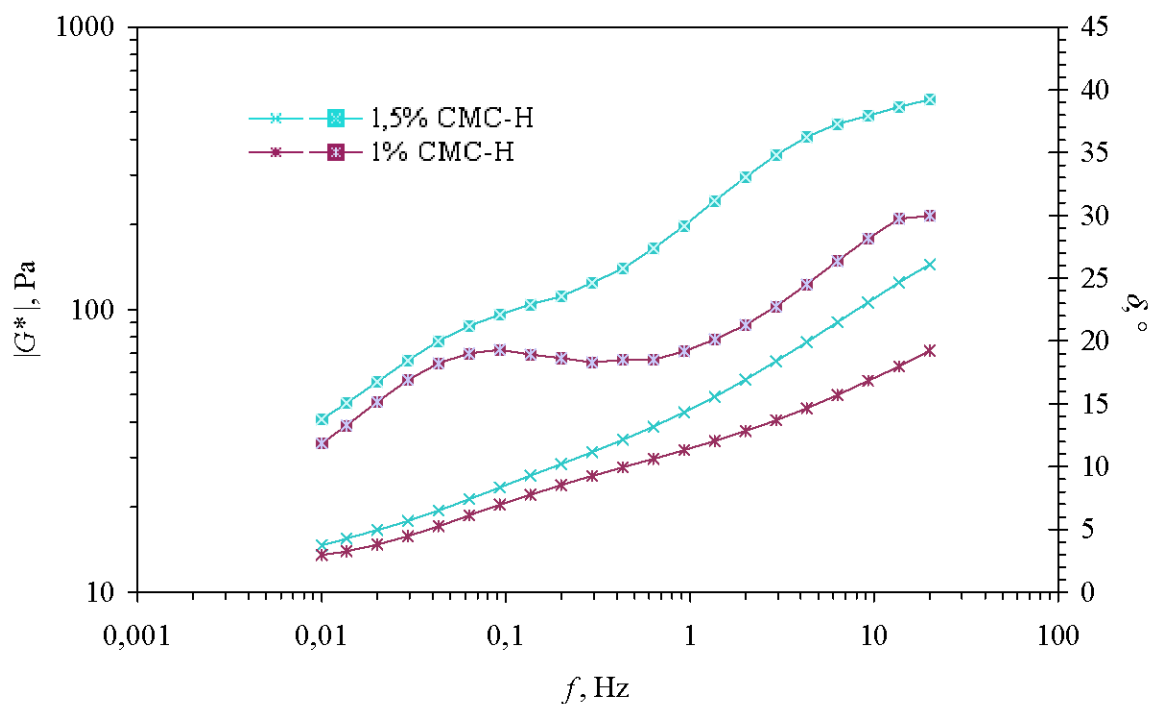
V této sekci bylo studováno reologické chování CMC-H, která byla získána neutralizací CMC-Na prostřednictvím HCl. Odstraněním sodných kationtů náhradou za vodíky vzniká její kyselá forma.

Pro výzkum kyselé formy byly připraveny 1,5% hm. a 1% hm. roztoky CMC-H (Obr. 35), u nichž se ukázalo, že ke gelovitému charakteru dochází již při nižších koncentracích, na rozdíl od CMC-Na, kde se takový jev vyskytuje až při zvýšené koncentraci nad 1,5% hm. Oscilační měření v obou koncentracích naznačují proplétání řetězců, protože vzorky podle ztrátového úhlu vykazují elastické chování, které se však se zvyšující frekvencí zeslabuje. Za elasticitu jsou pravděpodobně zodpovědné vodíkové můstky mezi jednotlivými segmenty (hydroxyl – hydroxyl, hydroxyl – karboxyl). Tvorba vodíkových můstků je podpořena i faktem, že disociace COOH skupin je při daném pH silně potlačena, čímž řetězec ztrácí polyelektrolytický charakter. Ze závislosti komplexního modulu na frekvenci vyplývá, že mechanická odolnost opět roste s koncentrací CMC-H, zvláště ve vysokých frekvencích.

Grafické znázornění závislosti viskozity na rychlostním gradientu bude uvedeno v další kapitole při vzájemném srovnání CMC-Na bez a s přidavky ostatních elektrolytů. Hodnoty indexu toků zmíněných koncentrací CMC-H jsou zobrazeny v tabulce 10. Z nich vyplývá, že změna pH prostředí nemá velký vliv na pseudoplastické chování.

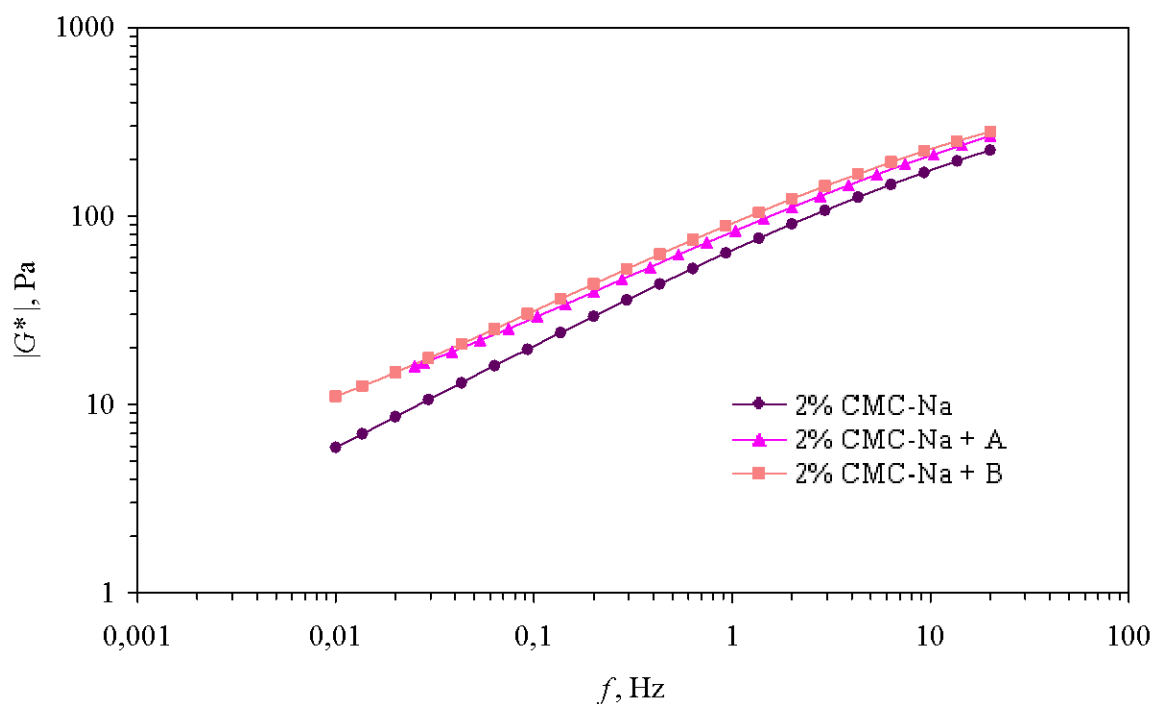
**Tabulka 10** Hodnoty indexu toků pro 1,5% hm. a 1% hm. CMC-H

w CMC-H, % hm.	Index toku $n$
1,5	0,521
1	0,539

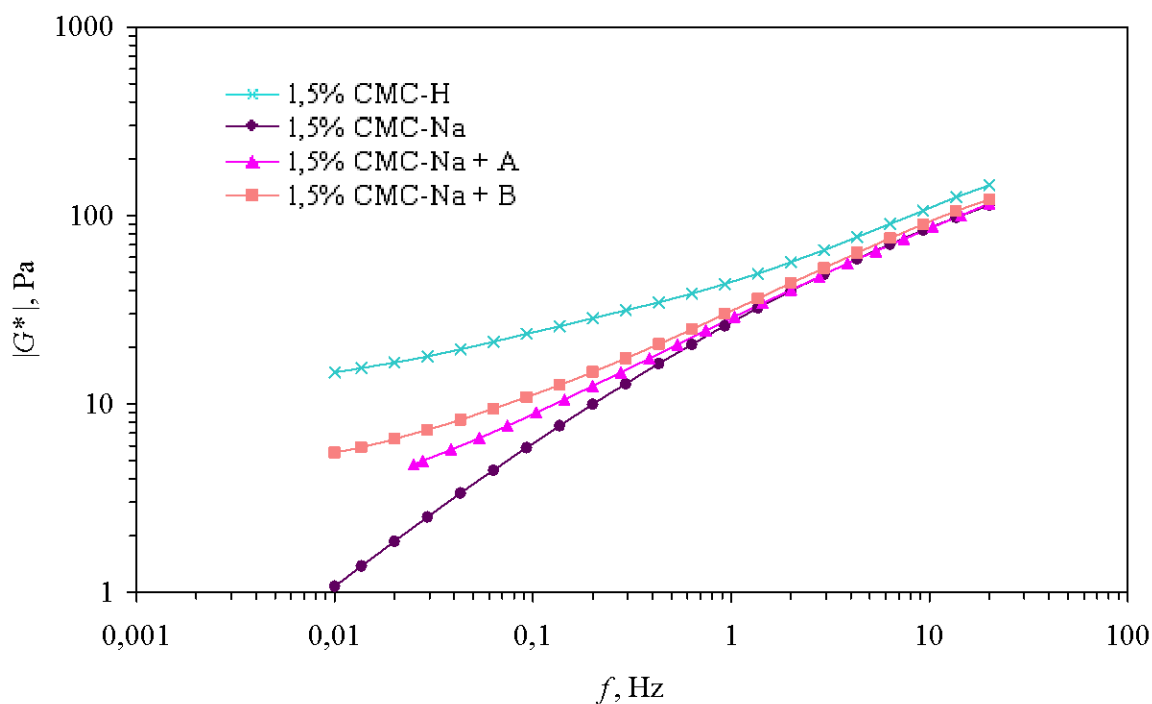


**Obr. 35** Znáznornění závislosti komplexního modulu  $G^*$  a ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro 1,5% hm. a 1% hm. roztoky CMC-H; prázdné body – komplexní modul, plné body – ztrátový úhel

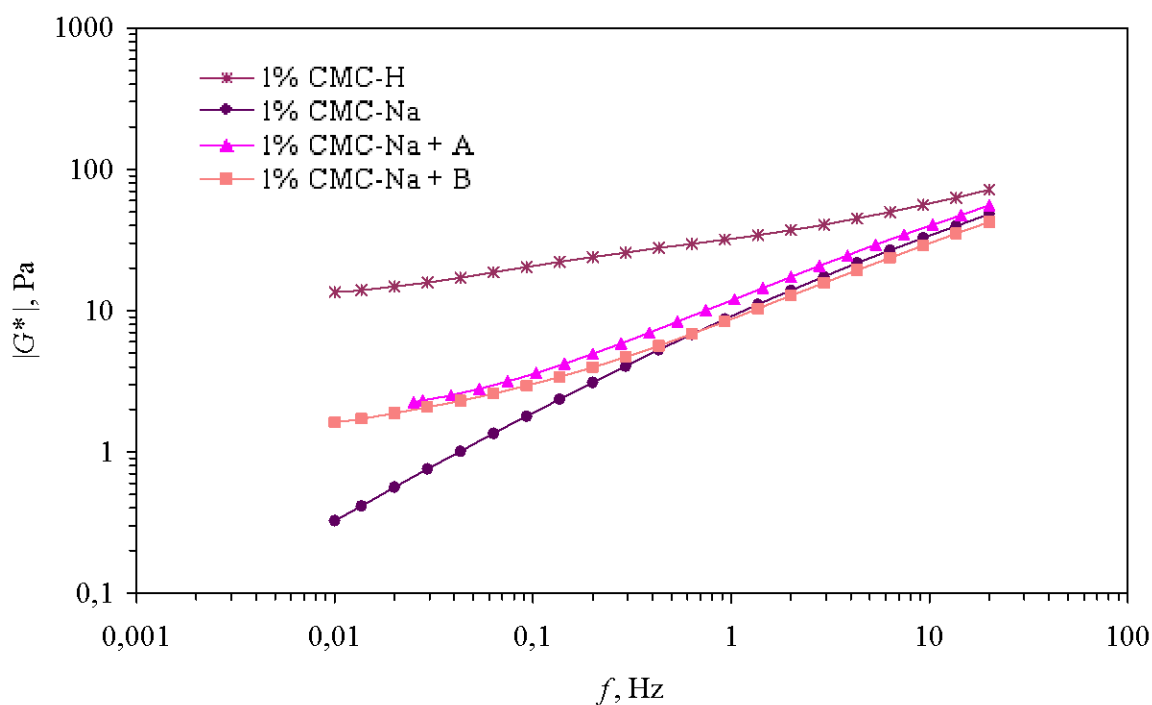
#### 4.1.3 Srovnání stejných koncentrací CMC-Na s přidavky elektrolytů a CMC-H



**Obr. 36** Grafická závislost komplexního modulu  $G^*$  na frekvenci  $f$  pro 2% hm. CMC-Na bez přidavku a s přidavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – NaCl, B –  $\text{CaCl}_2$

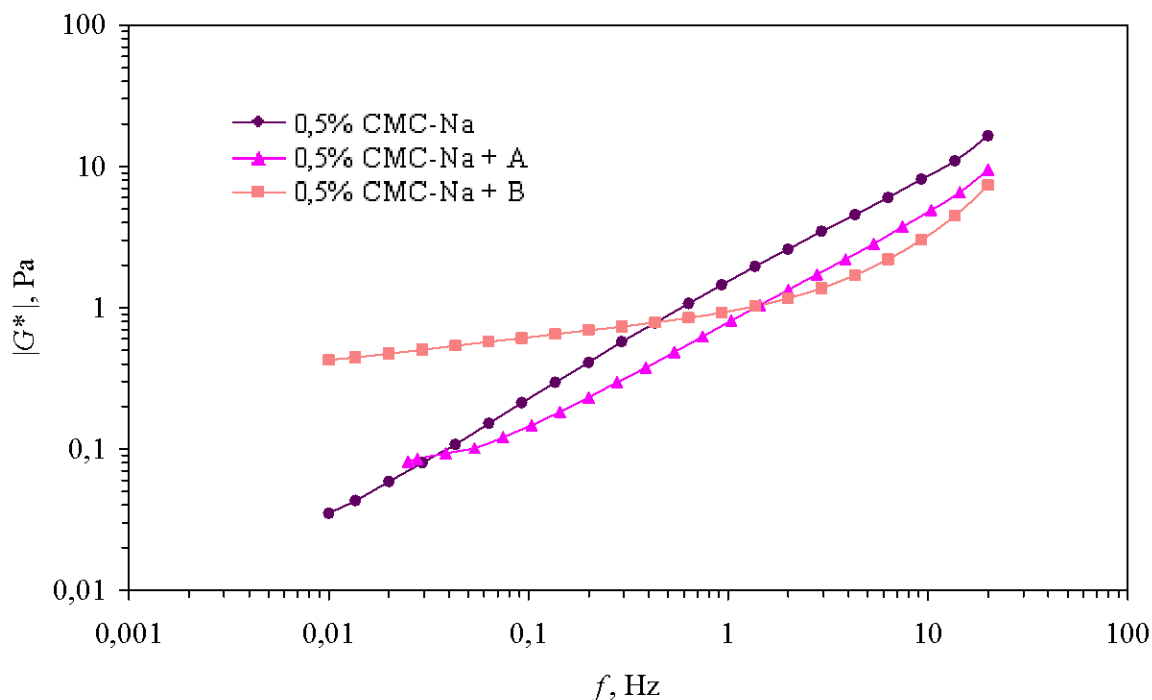


**Obr. 37** Grafická závislost komplexního modulu  $G^*$  na frekvenci  $f$  pro 1,5% hm. CMC-H a CMC-Na o stejné koncentraci bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – NaCl, B –  $\text{CaCl}_2$



**Obr. 38** Grafická závislost komplexního modulu  $G^*$  na frekvenci  $f$  pro 1% hm. CMC-H a CMC-Na o stejné koncentraci bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – NaCl, B –  $\text{CaCl}_2$



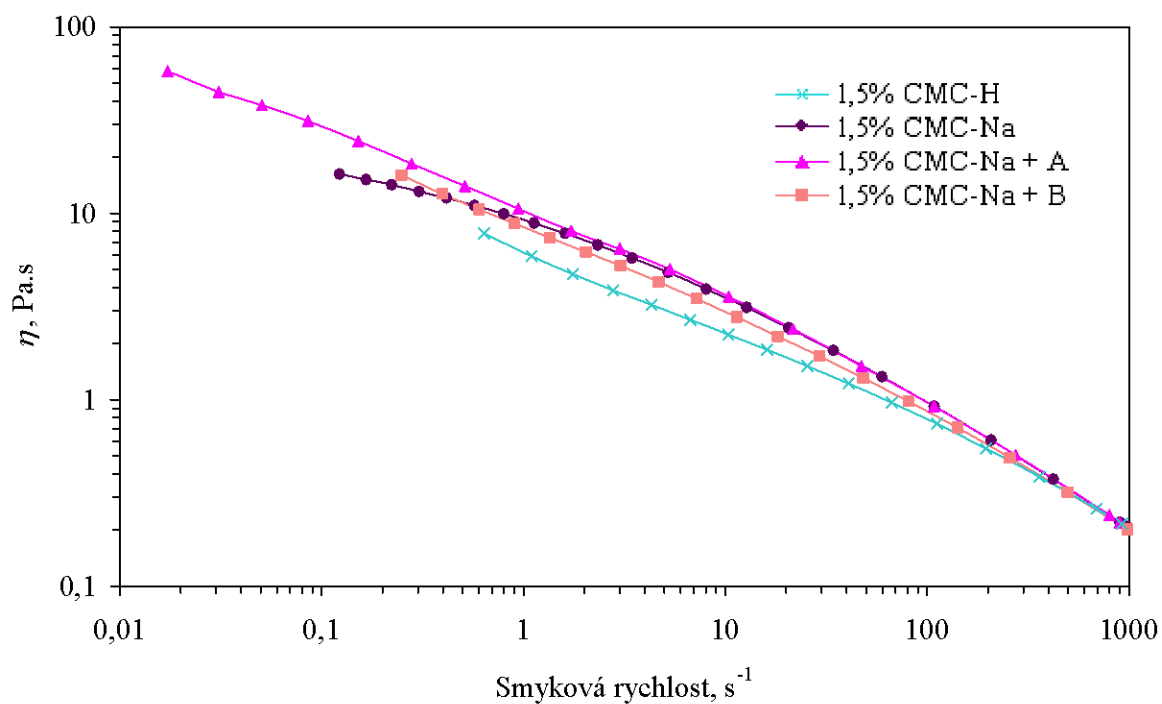


**Obr. 39** Grafická závislost komplexního modulu  $G^*$  na frekvenci  $f$  pro 0,5% hm. CMC-Na bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – NaCl, B –  $\text{CaCl}_2$

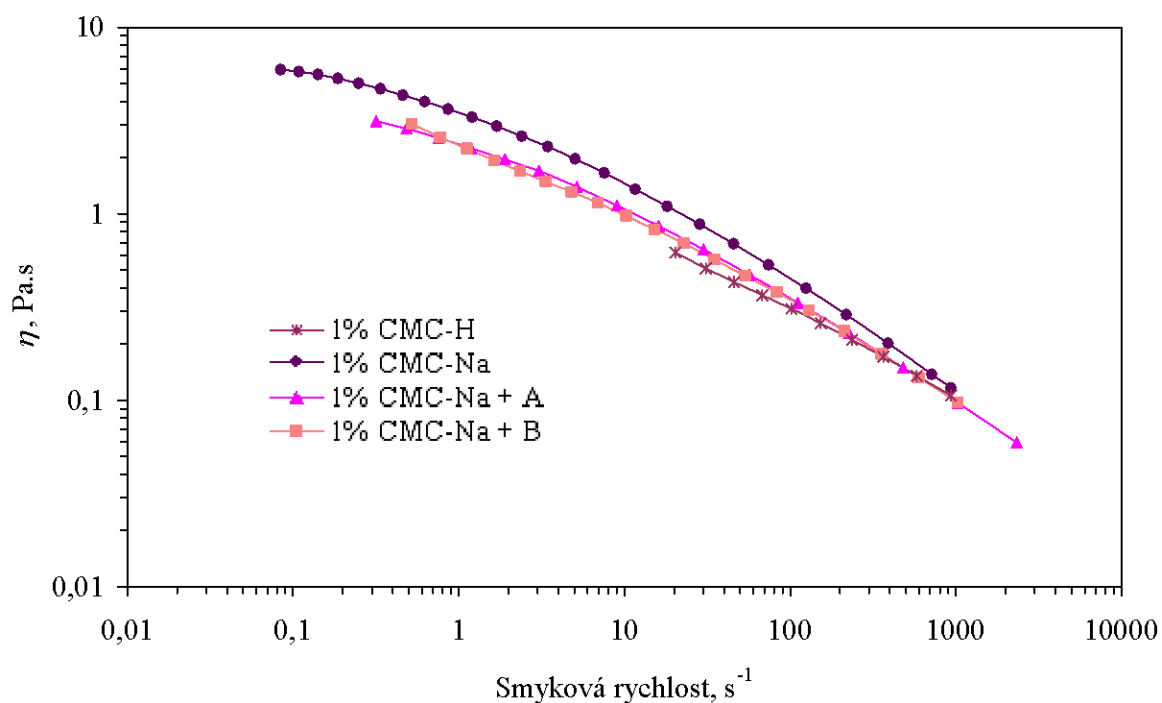
Na Obr. 36 a 39 jsou znázorněny tři závislosti komplexního modulu na frekvenci vždy pro stejnou koncentraci CMC-Na. První datová řada je tvořena čistou CMC-Na bez přídavku elektrolytu, druhá s přídavkem NaCl a třetí s  $\text{CaCl}_2$  o stejné iontové síle 0,1M. Tyto závislosti byly vytvořeny za účelem zjištění vlivu daných iontů o různém mocenství na mechanickou odolnost různě koncentrovaných roztoků CMC-Na. Grafy 37 a 38 jsou doplněny o kyselou formu CMC-H o téže koncentraci.

Z uvedených závislostí vyplývá, že přidané protiionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) mírně zpevňují strukturu 2% hm. vzorku CMC-Na (Obr. 36) v celém rozsahu frekvencí, avšak bez rozdílu v jejich náboji. Se snížením koncentrace CMC-Na na 1,5% hm. a 1% hm. (Obr. 37, 38) se tento efekt projevuje pouze v nízkých frekvencích (do  $\sim 1$  Hz). Lze tedy usuzovat, že při vyšších frekvencích dochází k rozrušení spojů vzniklých prostřednictvím protiiontů, což dokazuje jejich fyzikální povahu. U 0,5% hm. CMC-Na (Obr. 39) je vidět, že pouze přídavek vápenatých protiiontů významně posílil mechanickou stabilitu systému. V případě sodných iontů je průběh komplexního modulu na frekvenci podobný průběhu pro CMC-Na v čisté vodě, ale s poněkud nižšími hodnotami modulu. Jednou z možných interpretací je snížení rozměru klubka v důsledku vyšší iontové síly a tedy snížení už tak méně častých kontaktů mezi segmenty různých klubek pro tuto koncentraci.

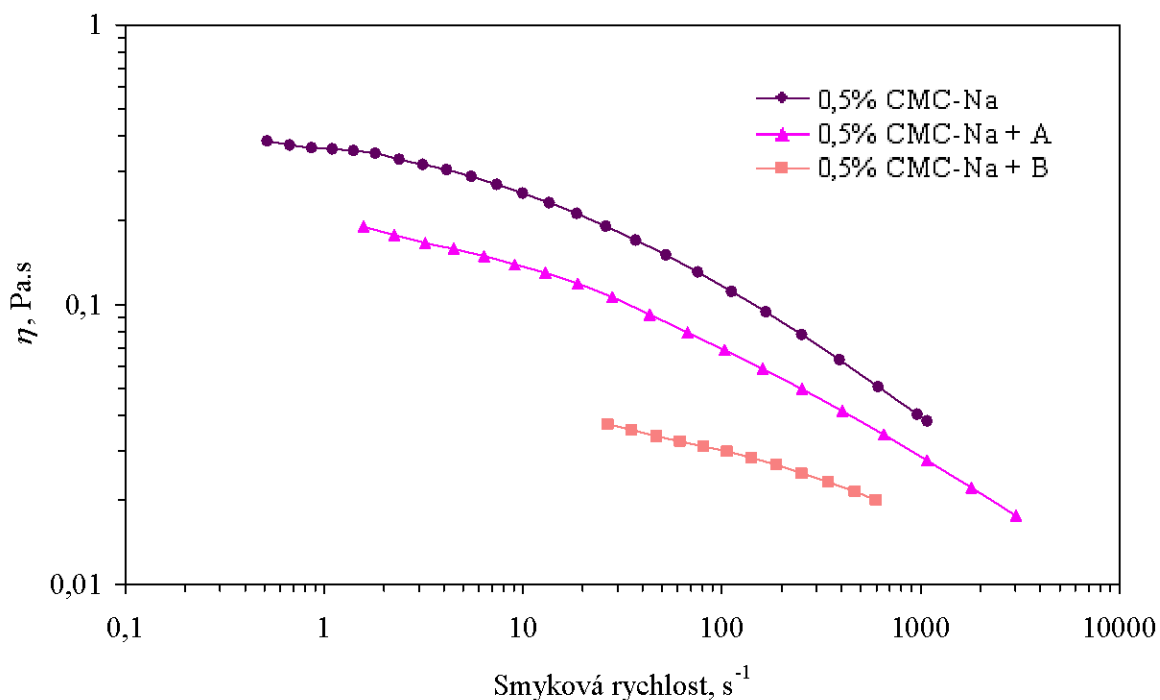
Patrná odlišnost je při změně pH roztoku, kdy protonizovaná forma roztoku CMC-H (Obr. 37 a 38) je ze všech uvedených vzorků mechanicky nejodolnější v celém rozsahu frekvencí, avšak tento jev se výrazně projevuje taktéž zejména v nižších frekvencích, řádově jednotek Hz. Příčinou je zvýšená tvorba vodíkových můstků z důvodu potlačené disociace karboxylových skupin.



**Obr. 40** Grafická závislost viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti pro 1,5% hm. CMC-H a CMC-Na o stejné koncentraci bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – 0,1M NaCl, B – 0,1M  $\text{CaCl}_2$



**Obr. 41** Grafická závislost viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti pro 1% hm. CMC-H a CMC-Na o stejné koncentraci bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – NaCl, B –  $\text{CaCl}_2$



**Obr. 42** Grafická závislost viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti pro 0,5% hm. CMC-Na bez přídavku a s přídavkem NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M; A – 0,1M NaCl, B – 0,1M  $\text{CaCl}_2$

V každém z uvedených grafů (Obr. 40–42) je znázorněno obdobné srovnání vlivů pH a přídavků elektrolytů na zdánlivou viskozitu a tokové vlastnosti studovaných vzorků.

V případě CMC-Na o koncentraci 1,5% hm. je patrné mírné zvýšení viskozity pouze v nízkých smykových rychlostech s přídavkem elektrolytů, což potvrzuje posílení mechanické stability systému pozorované v případě komplexního modulu pro stejné systémy. Se snižující se koncentrací CMC-Na je vliv iontové síly mnohem více výrazný. V případě roztoku o koncentraci CMC-Na 1% hm. se viskozita po přidání elektrolytů mírně snížila v celém měřeném rozsahu smykových rychlostí v porovnání s roztokem připraveným z destilované vody, nicméně vliv valence iontů je nevýznamný (Obr. 41). Pro vzorek o koncentraci 0,5% hm. lze vidět ještě výraznější snížení viskozity a také významný vliv valence iontů, kdy přídavek vápenatého iontu způsobil největší pokles viskozity (Obr. 42). Tento trend je pochopitelný, uvažíme-li, že zvýšení iontové síly způsobí kontrakci makromolekulárních domén a tím tedy snížení hydrodynamického poloměru a tedy i viskozity. Zarážející je výrazný vliv přídavku vápenatých iontů o stejné iontové síle jako v případě sodných iontů, z čehož opět vyplývá, že četnost interakcí mezi polymerními segmenty u 0,5% hm. vzorku jsou tak nízké, že již nejsou schopny odolávat efektu způsobenému kontrakcí klubek. Tato pozorování jsou však poněkud v kontrastu s oscilačními měřeními, kdy vzorky o nižší viskozitě vykazovaly zvýšení modulu elasticity oproti roztoku bez přídavku elektrolytu.

Na Obr. 40 a 41 jsou znázorněny i tokové křivky pro roztoky kyselé formy CMC-H o odpovídající koncentraci. Z těchto závislostí vyplývá, že roztoky CMC-H mají nižší viskozitu než roztoky původní sodné soli ve vodě. U 1,5% hm. CMC-H je tento efekt vyšší ve srovnání s vlivem přidaných protiiontů, což může být způsobeno tím, že při tomto pH (3,4–3,5; Tabulka 15) je silně potlačena disociace karboxylových skupin a polymer ztrácí svůj původní

polyelektrolytický charakter. Snížením koncentrace na 1% hm. se hodnoty viskozity kyselé formy a roztoků CMC-Na obsahujících přísady elektrolytů vyrovnávají (Obr. 41).

#### 4.1.4 CMC-Na v různě koncentrovaných roztocích $\text{CaCl}_2$

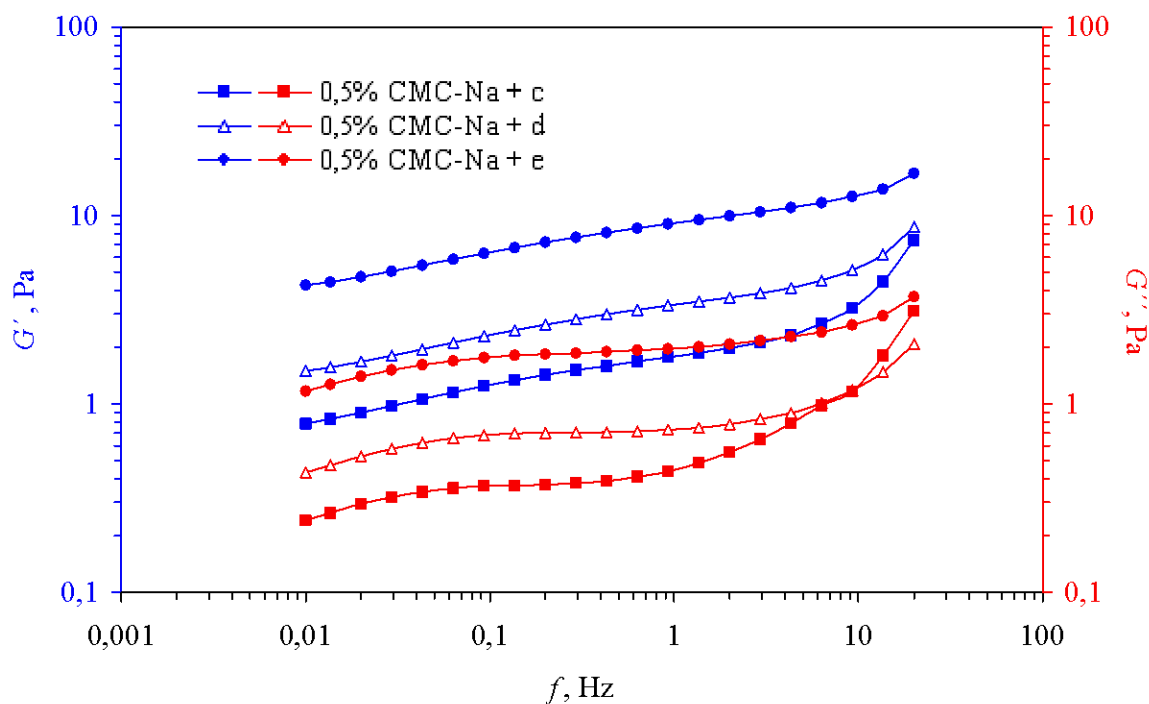
Z experimentů pro různě koncentrované roztoky CMC-Na v prostředí  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle  $I = 0,1\text{M}$  (viz část 4.1.1.2) bylo zjištěno, že mezi 0,5% hm. a 1% hm. vzorkem CMC-Na dochází k ne zcela očekávatelnému přechodu z elastického chování na viskózní. Z tohoto důvodu bylo prostudováno reologické chování těchto dvou roztoků také při různých koncentracích chloridu vápenatého.

##### 4.1.4.1 0,5% hm. CMC-Na v různě koncentrovaných roztocích $\text{CaCl}_2$

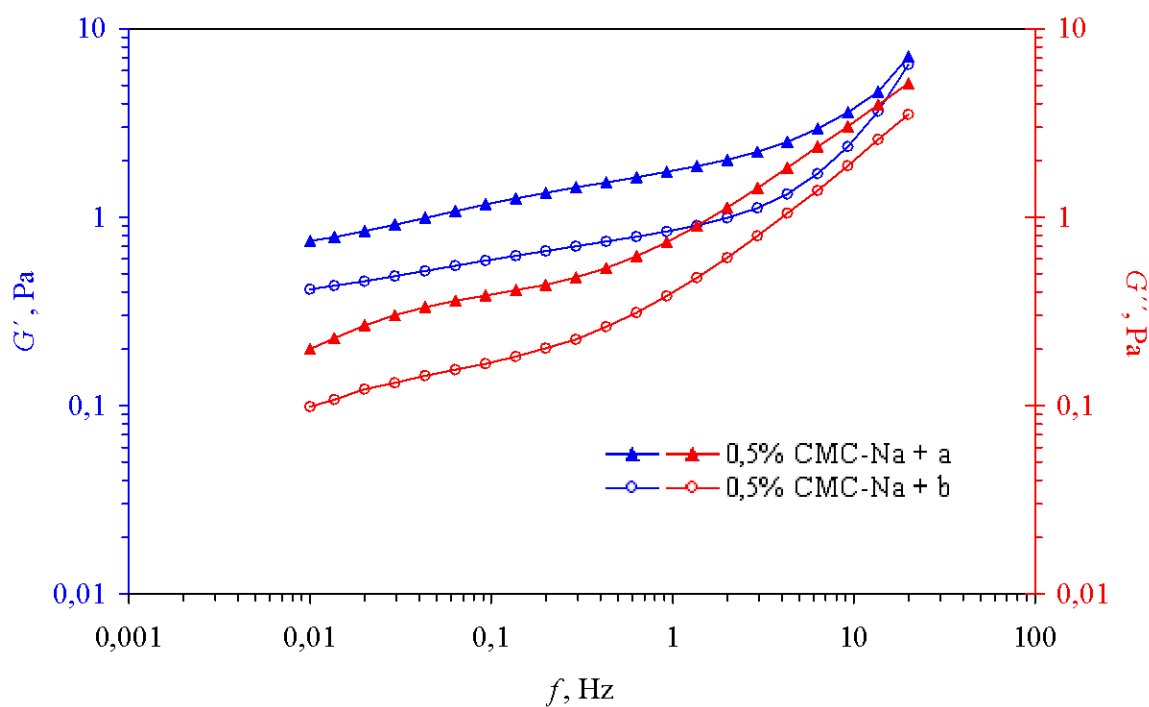
V grafech 43 a 44 jsou uvedeny závislosti modulů na frekvenci pro 0,5% hm. CMC-Na s přísady  $\text{CaCl}_2$  odpovídajícími iontové síle  $I = 0,05; 0,1; 0,2; 0,5$  a  $1\text{M}$ . Je patrné, že u všech uvedených vzorků převládá paměťový modul  $G'$  v některých případech téměř o řád, což nasvědčuje fyzikálnímu síťování a tvorbě gelovitých struktur ve vzorcích. Z průběhů obou modulů je patrné, že se zvyšujícím se přísadkem  $\text{CaCl}_2$  ( $I > 0,2\text{M}$ ) se mechanická odolnost zvyšuje. Tvorbu gelové sítě podporuje také rovněž průběh ztrátového úhlu na frekvenci, který se zvyšujícím se přísadkem  $\text{Ca}^{2+}$  zůstává nízký ( $\delta < 20^\circ$ ) v celém rozsahu měřených frekvencí (Obr. 45). Pro roztok s  $I = 0,1\text{M}$  byla pozorována anomálie, a sice pokles hodnot dynamických modulů se vzrůstem iontové síly (v porovnání s  $I = 0,05\text{M}$ ). Rovněž průběh závislosti ztrátového úhlu na frekvenci je odlišný, kdy v nízkých frekvencích má nejnižší hodnotu, a se vzrůstající frekvencí roste až do hodnot ztrátového úhlu nad hodnotami odpovídajícími iontové síle  $I = 0,05\text{M}$ . V tabulce 11 jsou uvedeny molární poměry karboxylových skupin a vápenatých iontů. K výše zmíněné anomálii dochází mezi poměry 1 : 0,9 a 1 : 1,7, což odpovídá již dříve zjištěnému kritickému poměru, který byl nalezen ze studia roztoků o různých koncentracích polymeru a konstantním přísadkem  $\text{CaCl}_2$  (4.1.1.2).

**Tabulka 11** Molární poměry iontů  $\text{COO}^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  pro 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle

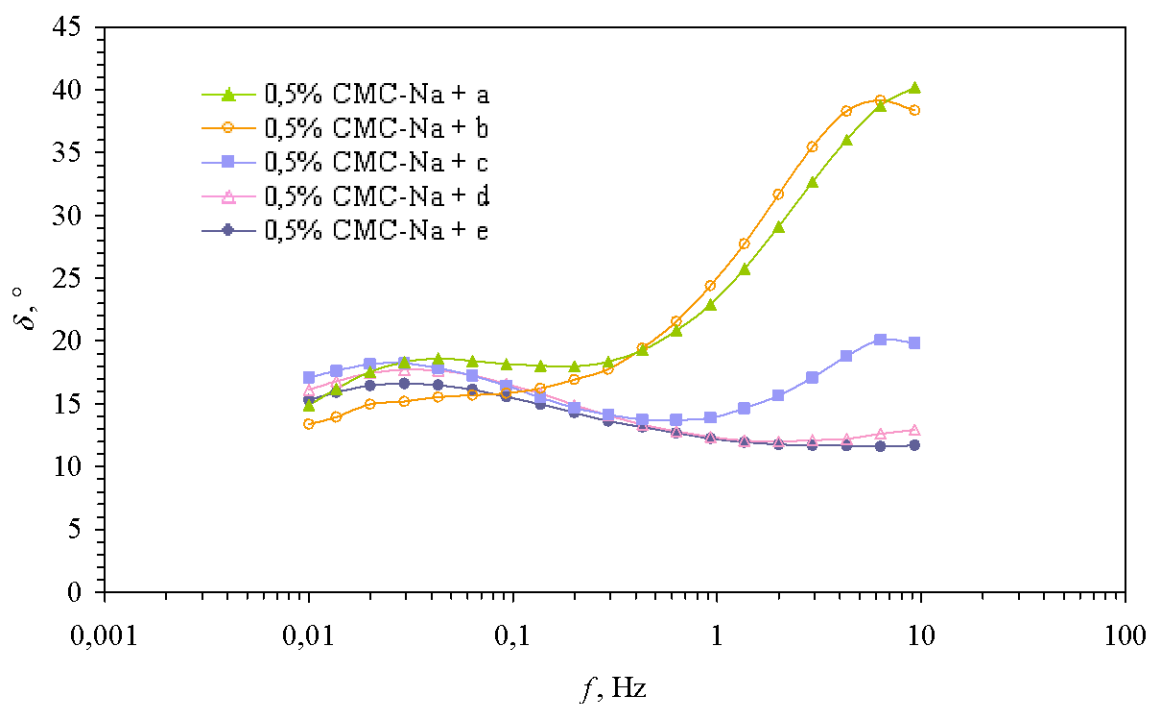
Iontová síla $\text{CaCl}_2$	$\text{COO}^- : \text{Ca}^{2+}$ , mol
0,05M	1 : 0,9
0,10M	1 : 1,7
0,20M	1 : 3,4
0,50M	1 : 8,7
1M	1 : 17,3



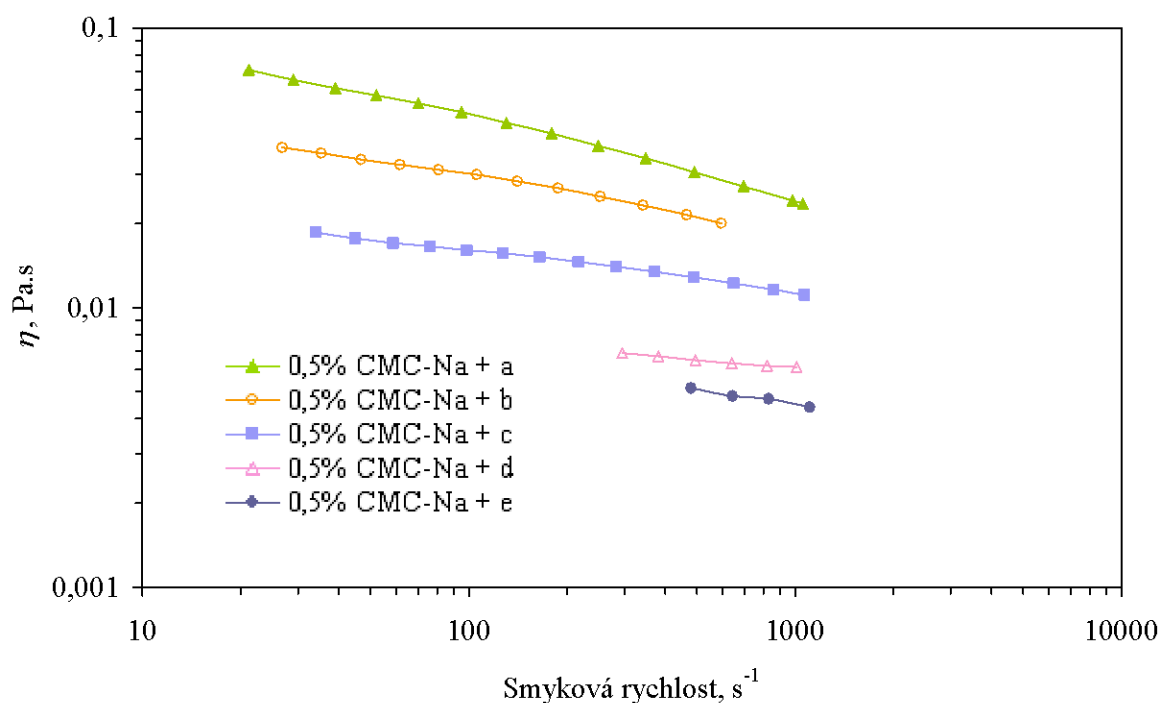
**Obr. 43** Graf závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ ); d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ )



**Obr. 44** Graf závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; a –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,05\text{M}$ ); b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ )



**Obr. 45** Znáznornění závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; a –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,05\text{M}$ ); b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ ); d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ )



**Obr. 46** Znáznornění závislosti viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pro 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; a –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,05\text{M}$ ); b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ ); d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ )

Tokové charakteristiky vzorků jsou znázorněny na Obr. 46, ze kterého je zřejmé, že se vzrůstající koncentrací  $\text{CaCl}_2$  v roztoku dochází ke snížení viskozity. Možným vysvětlením je opět kontrakce makromolekulárních domén vlivem přidavku protiiontů. Podle indexu toků se vzorky blíží k newtonskému chování (Tabulka 12). Hodnoty indexu toků pro vysoké koncentrace  $\text{CaCl}_2$  mohou být zatíženy chybou v důsledku malého počtu naměřených hodnot.

Výsledky tokových testů jsou poněkud v rozporu s výsledky oscilačních testů, kde bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace vápenatých iontů způsobuje síťování polymerních řetězců. Tokové testy navíc nevykazují žádnou anomálii pro roztok připravený s iontovou silou  $I = 0,1$ .

**Tabulka 12** Hodnoty indexu toků 0,5% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle

Iontová síla $\text{CaCl}_2$	Index toku $n$
1M	0,821
0,5M	0,904
0,2M	0,857
0,1M	0,804
0,05M	0,718

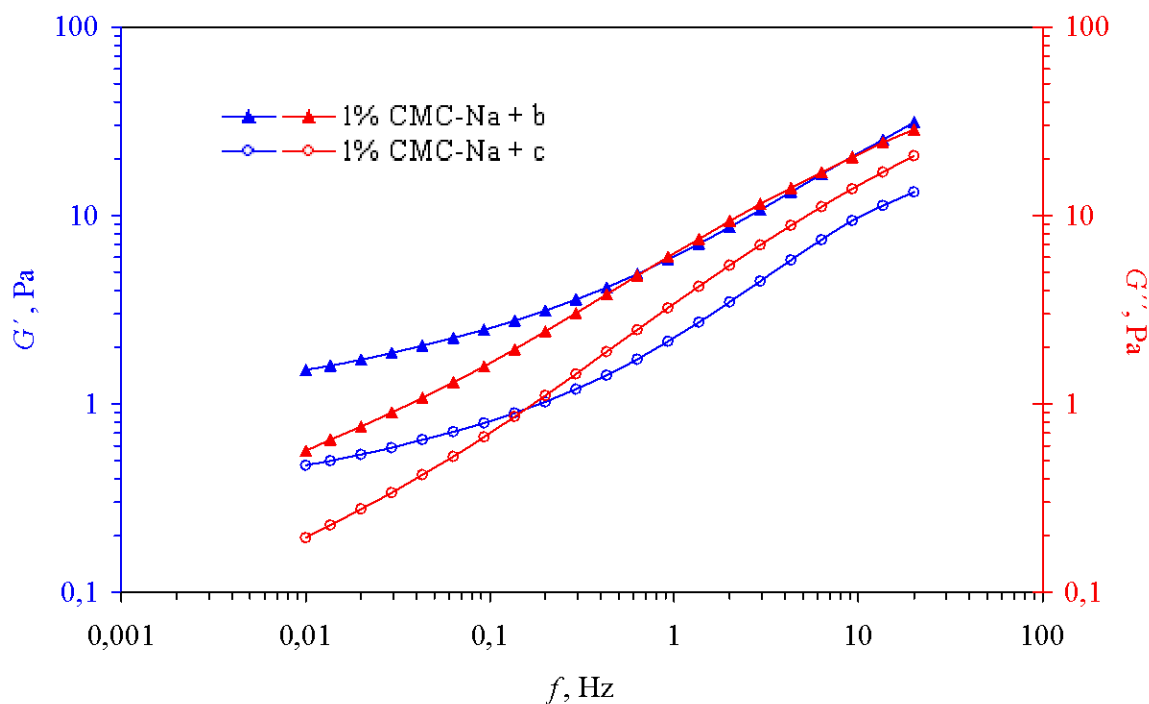
#### 4.1.4.2 1% hm. CMC-Na s různě koncentrovaným prostředím $\text{CaCl}_2$

Poslední kapitola je v podstatě opakováním experimentů z předchozí části pouze s tím rozdílem, že koncentrace CMC-Na byla zvýšena na 1% hm. Výsledky se shodují s výsledky pro 0,5% hm. CMC-Na, tzn. se vzrůstajícím přidavkem  $\text{Ca}^{2+}$  je opět vidět trend posílení mechanické odolnosti, zvýšení dynamických modulů, a elasticity systému danou poklesem ztrátového úhlu pro měřený rozsah frekvencí. Anomálie pozorovaná u 0,5% hm. s  $I = 0,1\text{M}$  byla pozorována i pro roztok o koncentraci 1% hm., ale o  $I = 0,2\text{M}$ . Avšak molární poměr karboxylů a vápenatých iontů je v tomto případě stejný jako pro 0,5% roztok CMC-Na. Hodnoty ztrátového úhlu jsou ve srovnání se systémem obsahujícím 0,5% CMC-Na poněkud vyšší a rostou nad hodnotu  $45^\circ$  při vyšších frekvencích ( $> 0,4\text{ Hz}$ ), což poukazuje na horší kvalitu spojů mezi řetězci. Anomální charakter u tohoto poměru ještě podporuje pozorování na Obr. 47, kdy systém s  $I = 0,2\text{M}$  vykazuje přechod z oblasti s převládajícím elastickým chováním do oblasti s kapalným charakterem při nižší frekvenci (0,2 Hz) než pro systém o  $I = 0,1\text{M}$  ( $\sim 1\text{ Hz}$ ), u něhož zůstávají moduly stejné. Vzorek s nižší iontovou silou ( $I = 0,1\text{M}$ ) se chová elasticky po delší dobu než vzorek o  $I = 0,2\text{M}$  a zároveň je mechanicky stabilnější.

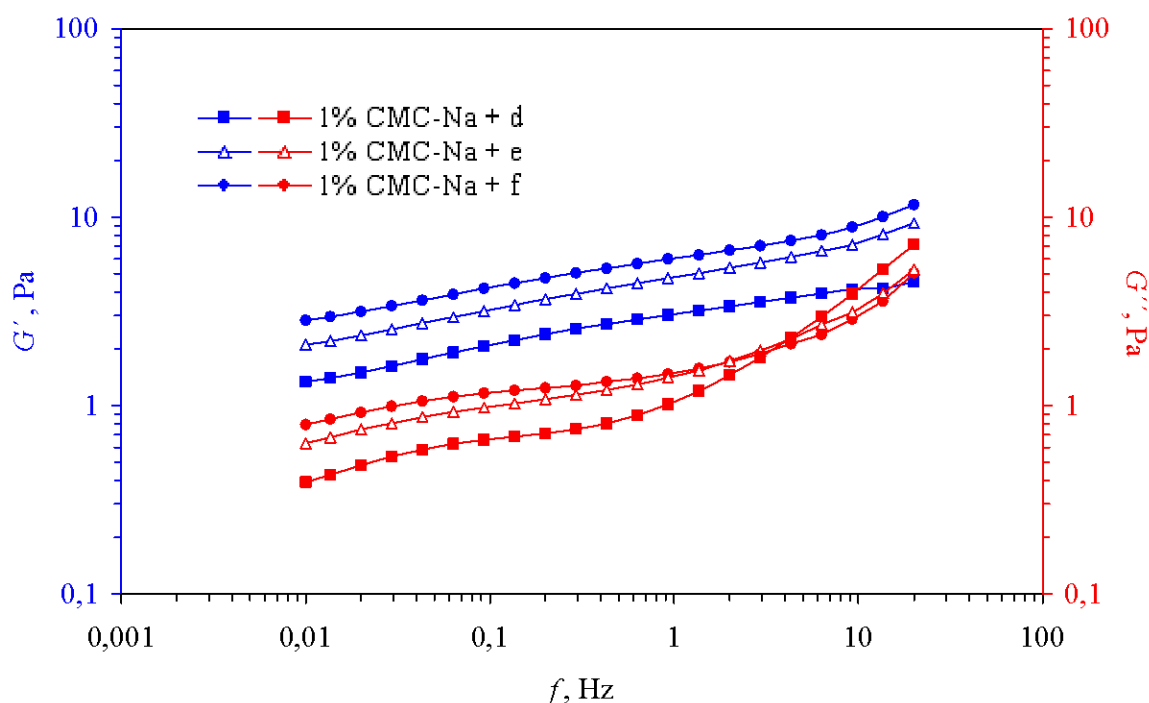
Tabulka 13 opět shrnuje molární poměry karboxylů a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pro jednotlivé roztoky CMC-Na odpovídající iontové síle.

**Tabulka 13** Molární poměry iontů  $\text{COO}^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  pro 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle

Iontová síla $\text{CaCl}_2$	$\text{COO}^- : \text{Ca}^{2+}$ , mol
0,1M	1 : 0,9
0,2M	1 : 1,7
0,5M	1 : 4,3
1M	1 : 8,7
2M	1 : 17,3

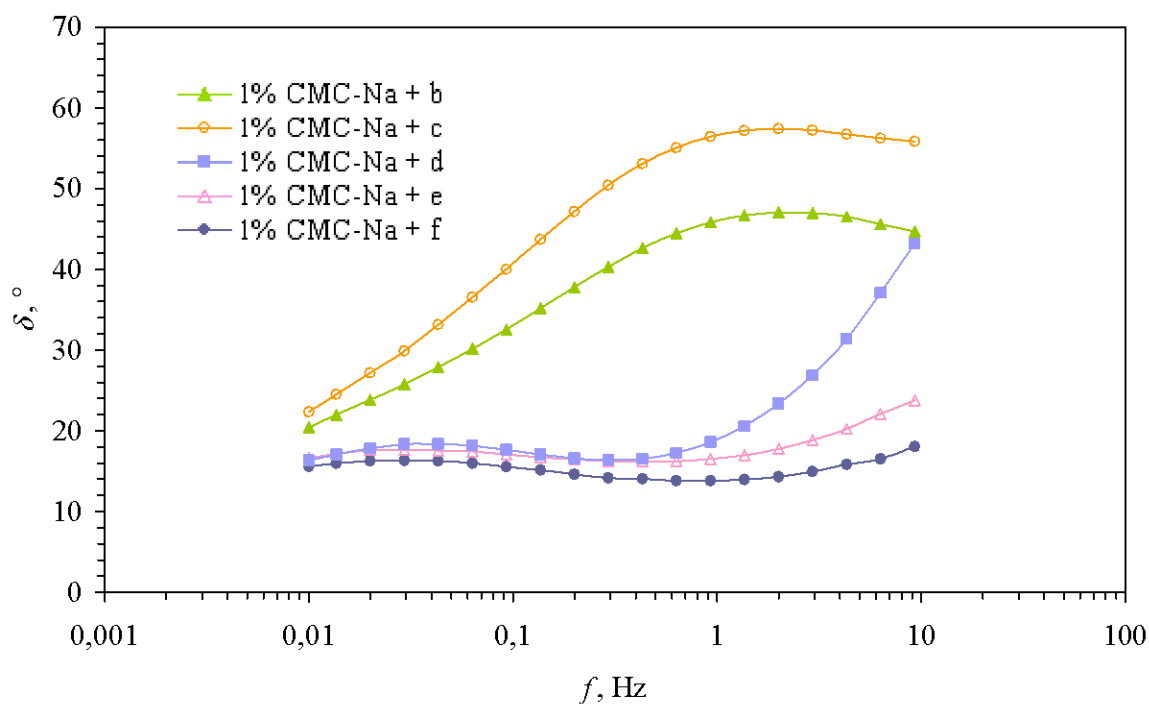


**Obr. 47** Graf závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ )

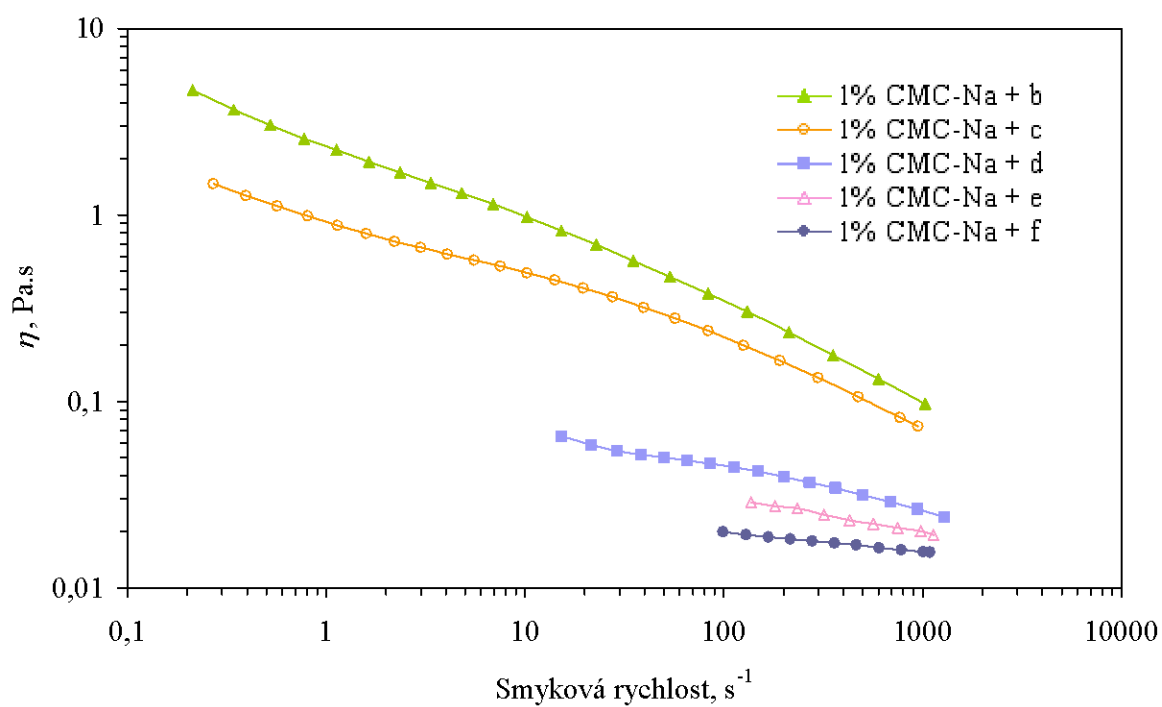


**Obr. 48** Graf závislosti paměťového  $G'$  a ztrátového  $G''$  modulu na frekvenci  $f$  pro 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ ); f –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 2\text{M}$ )





**Obr. 49** Znáznornění závislosti ztrátového úhlu  $\delta$  na frekvenci  $f$  pro 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ ); d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ ); f –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 2\text{M}$ )



**Obr. 50** Znáznornění závislosti viskozity  $\eta$  na smykové rychlosti  $\dot{\gamma}$  pro 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle; b –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,1\text{M}$ ); c –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,2\text{M}$ ); d –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 0,5\text{M}$ ); e –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 1\text{M}$ ); f –  $\text{CaCl}_2$  ( $I = 2\text{M}$ )

Na Obr. 50 jsou znázorněny tokové křivky 1% hm. CMC-Na s různě koncentrovanými přísadkami  $\text{CaCl}_2$ . Je pozorován stejný trend jako v předchozím případě u 0,5% hm. CMC-Na tzn., že s rostoucí koncentrací vápenatých iontů v roztoku klesá také viskozita. U těchto roztoků však se snižující se koncentrací roste míra nenewtonského chování (Tabulka 14).

**Tabulka 14** Hodnoty indexu toků 1% hm. CMC-Na v roztocích  $\text{CaCl}_2$  o různé iontové síle

Iontová síla $\text{CaCl}_2$	Index toku $n$
2M	0,896
1M	0,809
0,5	0,790
0,2	0,654
0,1	0,560

#### 4.1.5 Měření pH

**Tabulka 15** Hodnoty pH pro různě koncentrované roztoky CMC-Na bez přísadky a její kyselé formy

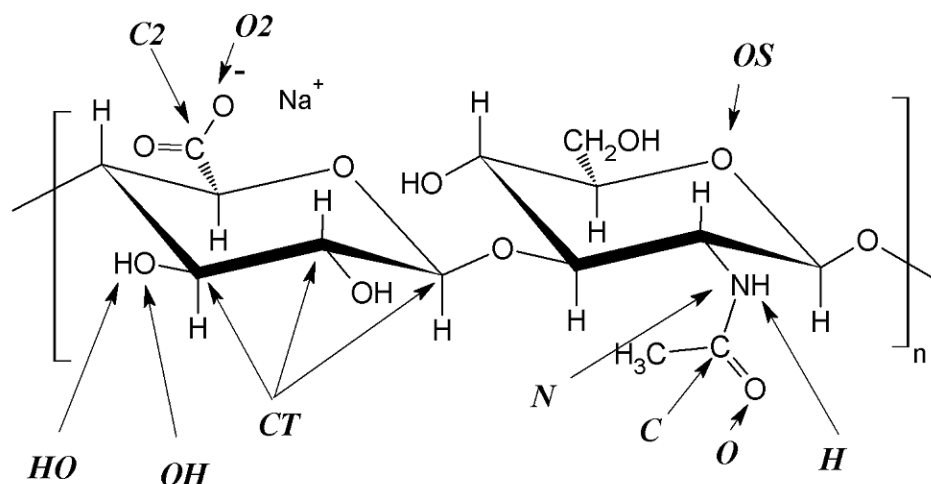
w CMC-Na, % hm.	pH CMC-Na bez přísadky	pH CMC-H
0,25	7,22	-
0,50	7,25	-
1,00	7,27	3,45
1,50	7,30	3,36
2,00	7,33	-

**Tabulka 16** Hodnoty pH pro různě koncentrované roztoky CMC-Na s přísadkou NaCl a  $\text{CaCl}_2$  o iontové síle 0,1M

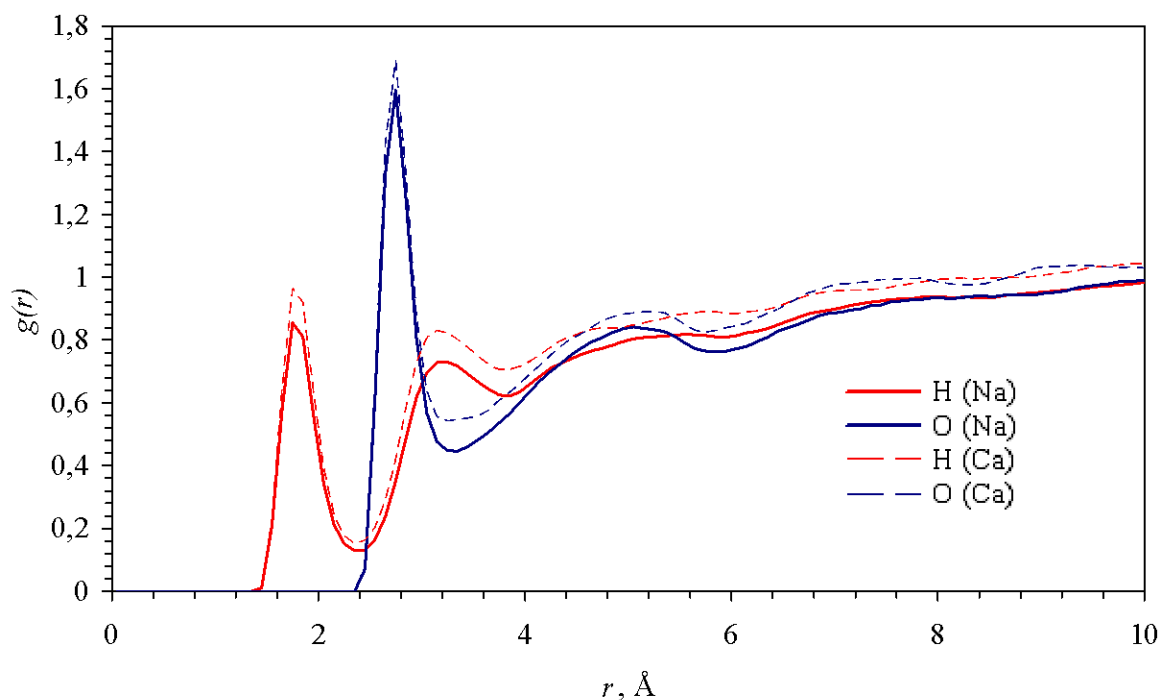
w CMC-Na, % hm.	pH CMC-Na s přísadkou NaCl ( $I = 0,1\text{M}$ )	pH CMC-Na s přísadkou $\text{CaCl}_2$ ( $I = 0,1\text{M}$ )
0,25	6,68	6,66
0,50	6,71	6,71
1,00	6,73	6,74
1,50	6,76	6,81
2,00	6,85	6,96
	pH NaCl ( $I = 0,1\text{M}$ ): 6,60	pH $\text{CaCl}_2$ ( $I = 0,1\text{M}$ ): 6,58

## 4.2 Počítačové simulace

Z nasimulovaných trajektorií byly pomocí programu *radial.x* (součást programového balíku Tinker) získány radiální distribuční funkce (rdf) mezi základními typy atomů tvořících hyaluronan a molekulami vody, resp. atomy kyslíku a vodíku v molekule vody. Sledované typy atomů jsou znázorněny v Obr. 51 pomocí šipek. Rdf byly určeny ve vzdálenostech s krokem 0,05 Å.

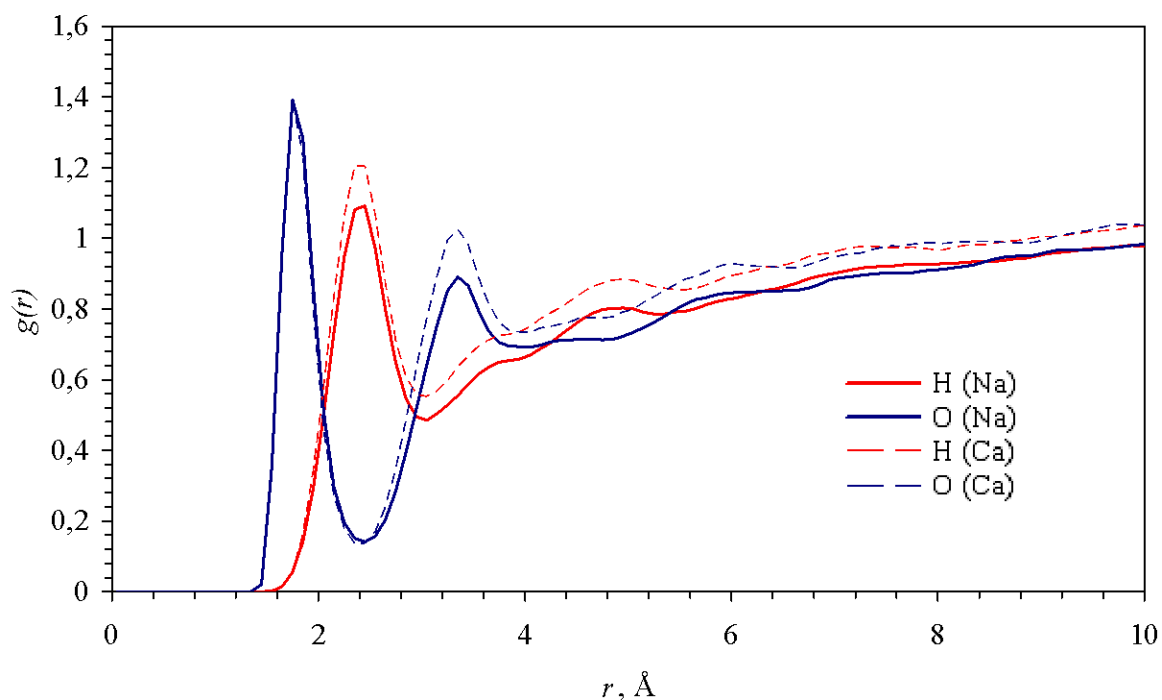


**Obr. 51** Rozmístění důležitých typů atomů v jednotce hyaluronanu sodného



**Obr. 52** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem OH (kyslík v hydroxylových skupinách HA-Na a HA-Ca)

Na Obr. 52 jsou znázorněny rdf mezi kyslíkovými atomy hydroxylových skupin (v Obr. 51 jsou značeny jako OH) a kyslíkem (modrá křivka) a vodíkem (červená křivka) molekuly vody. Tenké čárkované křivky značí totožné funkce, ovšem získané ze simulací obsahující vápenaté ionty místo sodných. Na modrých křivkách je patrné výrazné maximum v okolí  $r = 2,85 \text{ \AA}$ . Toto naznačuje silnou přitažlivou interakci mezi hydroxylovým kyslíkem a molekulami vody, které se vyskytují v této vzdálenosti. Maximum na červené křivce naznačuje, že tato interakce je zprostředkována vodíkovými vazbami (toto maximum je o  $\sim 1 \text{ \AA}$  blíže než maximum na modré křivce, tzn. sousední molekula vody je orientována jedním ze svých vodíků přímo směrem k hydroxylovému kyslíku).

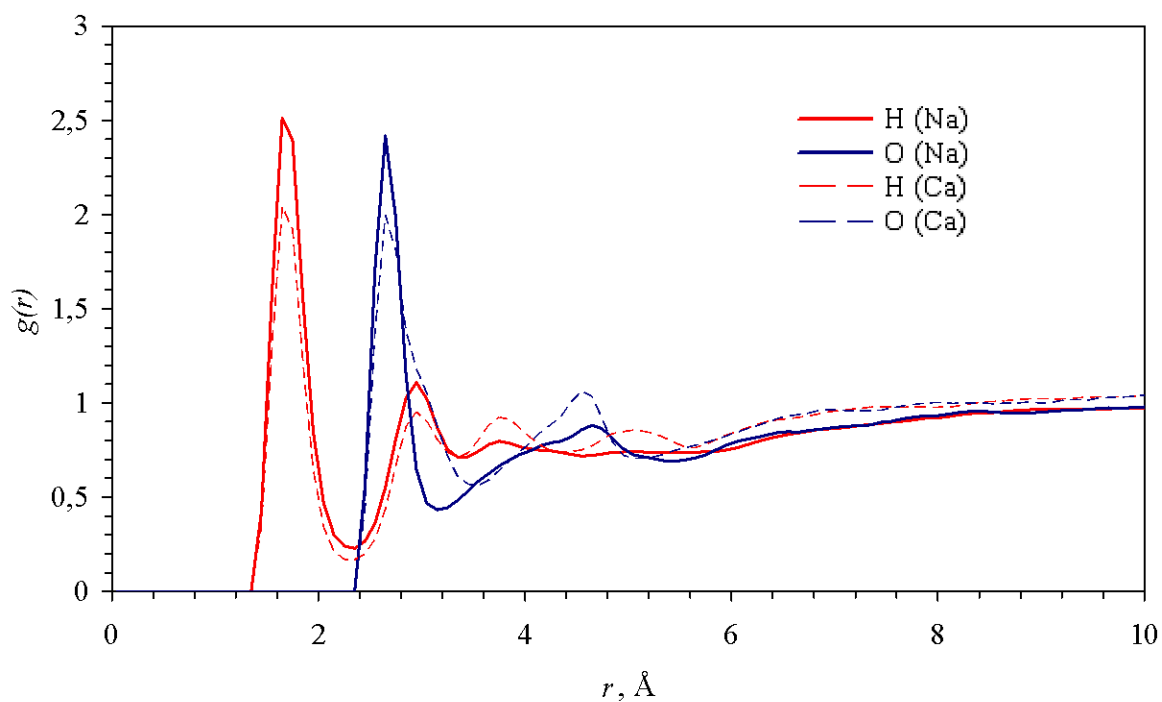


**Obr. 53** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem HO (vodík v hydroxylových skupinách HA-Na a HA-Ca)

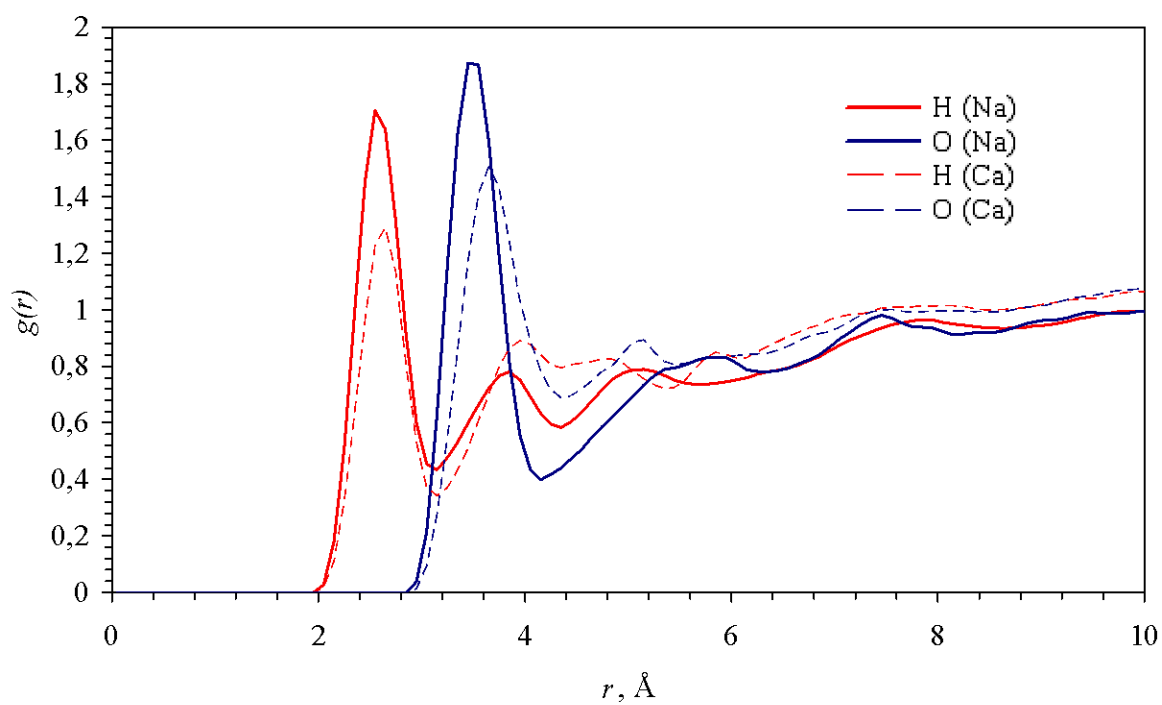
Průběh rdf mezi vodíkem hydroxylové skupiny a atomy tvořící molekulu vody je znázorněn na Obr. 53. Modrá křivka opět představuje rdf vzhledem ke kyslíkovému atomu vody, červená křivka vzhledem k vodíkovému atomu, čárkované křivky jsou výsledky ze simulací obsahující vápenaté ionty namísto sodných; toto schéma bude dodržováno ve všech grafech této kapitoly. Lze vidět, že pořadí maxim na modré a červené křivce je obrácené – pík na modré křivce je způsoben opět vodíkovou vazbou, v níž molekula vody vystupuje jako donor elektronového páru. Maximum na červené křivce se objeví v důsledku přítomnosti vodíkových atomů v navázané molekule vody. Tyto vodíkové atomy jsou orientovány na opačnou stranu, proto je maximum na červené křivce při vzdálenostech vyšších o  $0,7 \text{ \AA}$ .

Hydratace v okolí karboxylových skupin v glukuronových jednotkách je znázorněna na Obr. 54 a 55. Tyto karboxylové skupiny jsou záporně nabitě, v důsledku čehož přitahují kladně nabitě části molekul vody (atomy vodíku). To se projeví výrazným maximem na rdf mezi atomem typu O2 (kyslík v karboxylové skupině) a vodíky vody, které je opět o  $\sim 1 \text{ \AA}$  předstunuté před maximum na rdf mezi atomem O2 a kyslíkem z molekuly vody (Obr. 54). Obdobný průběh mají i distribuční funkce pro atom C2 a molekul vody. Vzhledem k tomu, že

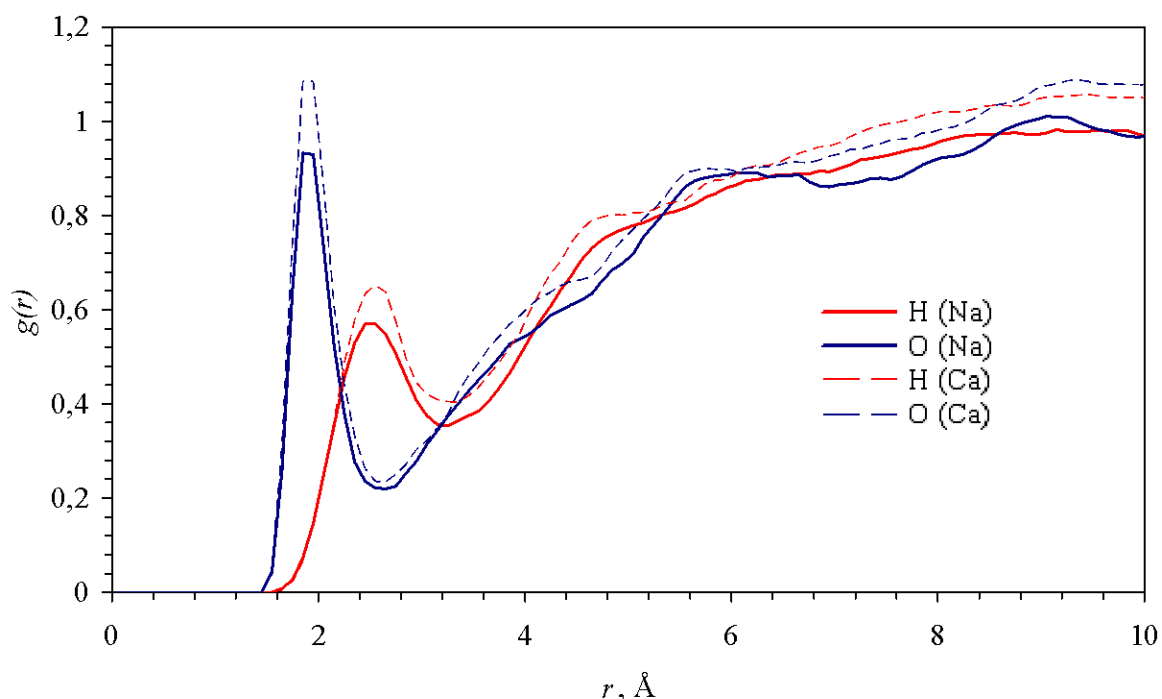
pík na rdf mezi atomem C2 a kyslíkem vody je při  $\sim 3,55$  Å, což přesahuje součet poloměrů uhlíkového a kyslíkového atomu, takže se dá udělat závěr, že molekula vody v blízkosti tohoto atomu C2 se zdržuje proto, že je vázána na dva kyslíkové atomy karboxylu O2.



**Obr. 54** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem O2 (kyslík v karboxylových skupinách HA-Na a HA-Ca)



**Obr. 55** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem C2 (uhlík v karboxylových skupinách HA-Na a HA-Ca)

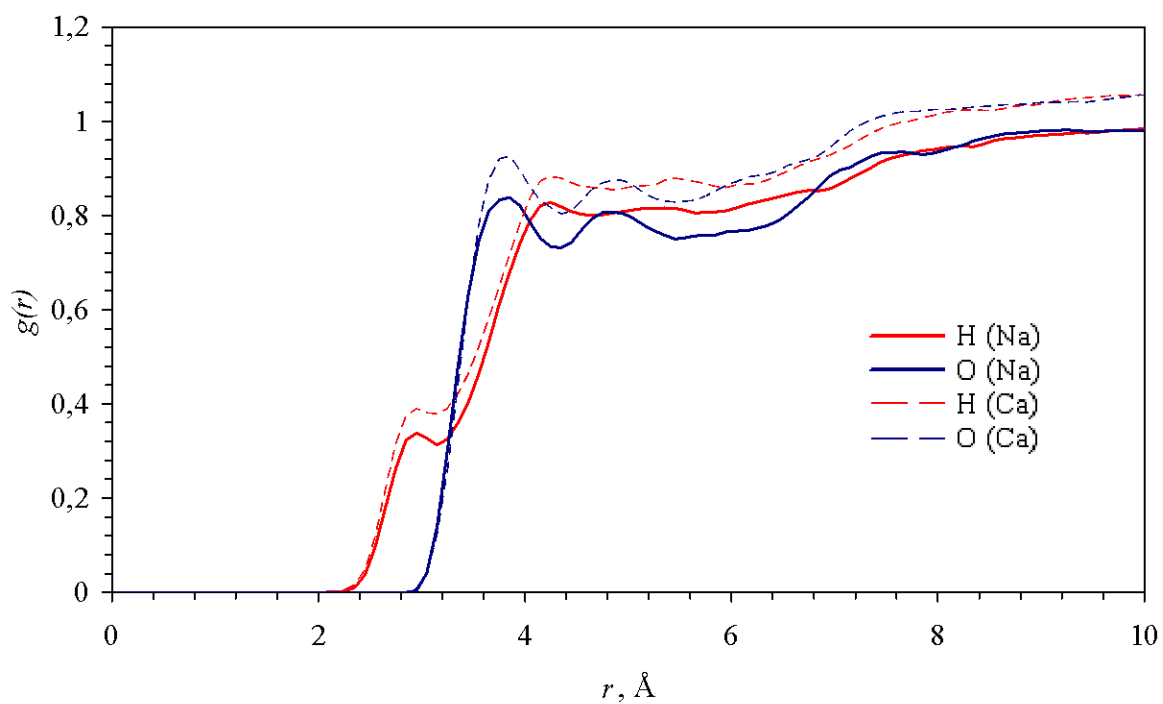


**Obr. 56** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem H (vodík v *N*-acetyl-*D*-glukosaminu)

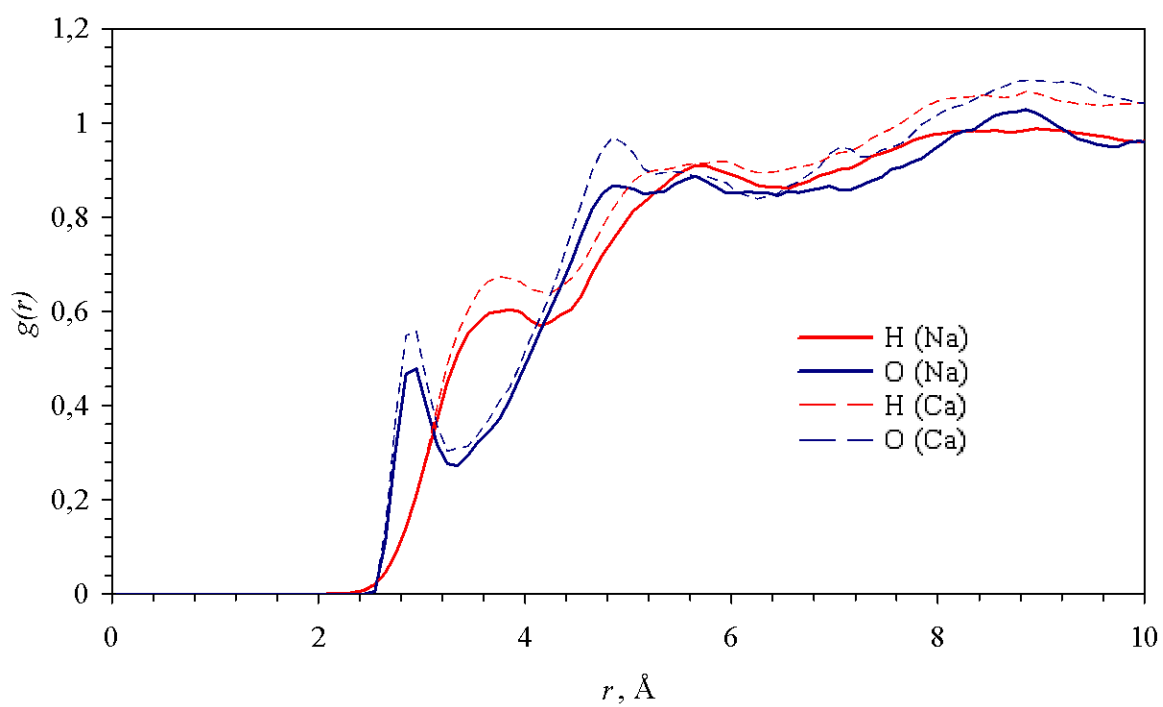
Na Obr. 56 je znázorněn průběh rdf mezi atomem vodíku vázaného k dusíku v *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a molekulami vody. Tento atom nese velký parciální kladný náboj a proto je schopen přijmout volný elektronový pár od kyslíkového atomu molekuly vody. Toto se projeví maximem na rdf mezi atomem H a kyslíkem vody při vzdálenosti kolem  $r = 1,95 \text{ Å}$ , což je mírně delší vzdálenost než v případě vodíkových vazeb tvořených s hydroxylovými skupinami. Maximum na červené křivce při vyšších vzdálenostech naznačuje, že molekula vody vázaná k atomu H je orientována svými vodíkovými atomy opět na opačnou stranu. Almond a kol. [39–43] zjistili, že tato molekula vody je schopná se natočit tak, že se jedním ze svých vodíkových atomů váže ke karboxylu na sousední jednotce.

Ostatní sledované atomy nevykazují specifické přitažlivé interakce vůči molekulám vody. Na Obr. 57 je znázorněn průběh rdf mezi uhlíkovými atomy glukózových jednotek a atomy molekuly vody. Absence výrazných píků ukazuje na hydrofobní charakter těchto atomů. Obdobně se chovají i jiné atomy, což se např. u éterového kyslíku OS a kyslíku v karbonylové skupině a dusíku v *N*-acetyl-*D*-glukosaminu (Obr. 58) jeví překvapivým. Zřejmě to bude v důsledku prostorového ukrytí těchto skupin.

V případě dusíkového atomu je navíc zvláštní, že malý pík na rdf mezi atomem dusíku a kyslíkem vody se projeví při nižších vzdálenostech než pík na rdf mezi dusíkem a vodíkem. Je zvláštní, že dusík s parciálním záporným nábojem přitahuje kyslík z vody, který sám má také záporný náboj. Opět se jedná zřejmě o důsledek vlivu sousedních skupin, pravděpodobně vodíku navázaného na dusíkovém atomu. S ohledem na délku vazby N – H ( $1,0 \text{ Å}$ ) a délku vodíkové vazby mezi atomem H a kyslíkem vody ( $1,95 \text{ Å}$ ), lze očekávat polohu tohoto maxima při  $2,95 \text{ Å}$ , což je patrné i z Obr. 58.



**Obr. 57** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a uhlíkovými atomy na glukózových jednotkách



**Obr. 58** Radiální distribuční funkce mezi atomy vody a atomem dusíku v *N*-acetyl-*D*-glukosaminu

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo studovat reologické chování roztoků CMC-Na jak ve vodě, tak v prostředí obsahujícím sodné a vápenaté ionty. Byly připraveny 3 základní řady vzorků, přičemž každá z nich obsahovala 5 různých koncentrací CMC-Na. Studována byla také její kyselé forma CMC-H. Reologické vlastnosti CMC-Na, resp. CMC-H byly charakterizovány prostřednictvím dynamických modulů (paměťového  $G'$ , ztrátového  $G''$ , komplexního  $|G^*|$ ), ztrátového úhlu  $\delta$  a zdánlivé viskozity  $\eta$ .

S ohledem na skutečnost, že síla elektrostatických interakcí mezi dvojmocným kationtem a jednomocným aniontem je dvakrát silnější v porovnání se dvěma jednomocnými ionty opačného znaménka, můžeme předpokládat, že dvojmocné ionty se budou ochotněji účastnit tvorby iontových párů a takto vzniklé spoje budou pevnější. V případě roztoků aniontových polyelektrolytů je možné usuzovat, že dvojmocné kationty mohou tvořit můstky mezi dvěma nabitými segmenty různých řetězců a tak vytvářet síť a zpevňovat strukturu systému. To by mělo vést ke zvyšování hodnoty zdánlivé viskozity a paměťového modulu, případně poklesu ztrátového úhlu.

Při první úvaze se jako ideální jeví poměr iontů 2 : 1 (karboxyly : dvojmocné kationty). Pokud je v systému méně dvojmocných kationtů, vznikající síť obsahuje méně uzlů a je méně pevná. V případě nadbytku dvojmocných iontů může naopak dojít k nasycení všech aniontových skupin na řetězci a dvojmocné ionty pak nemohou tvořit můstky mezi různými segmenty polymeru.

Experimenty provedené v rámci této DP tento model ne zcela dokonale podporují, některá pozorování se jeví být s ním přímo v rozporu. Celkem malý rozdíl mezi chováním systémů obsahujících elektrolyt s jednomocnými ionty a systémů obsahujících dvojmocné ionty při vysokých koncentracích polymeru je možné připsat skutečnosti, že reologické vlastnosti koncentrovaných roztoků polymerů jsou dominantně určeny interakcemi mezi segmenty.

Reologickými experimenty byl dokázán síťující účinek vápenatých iontů, který však závisí na molárním poměru karboxylových skupin a vápenatých iontů. V systémech, kde byl tento poměr nad 1 : 1,7 ( $\text{COO}^- : \text{Ca}^{2+}$ ) došlo v systému ke zvýšení mechanické stability a v systému převládalo elastické chování. Při nižším poměru docházelo k anomálii, která vedla k opačnému efektu, tzn. zhoršení mechanické stability a elasticity. Jedním možným vysvětlením je kompetitivní efekt zvyšování iontové síly vedoucí ke kontrakci makromolekulárních domén a ke snížení četnosti interakcí mezi nimi na jedné straně, a síťovací účinnost bivalentního iontu na straně druhé.

Přídavek sodných iontů síťování nezpůsobuje, nicméně v koncentracích polymeru nad 1% přispívá k mírnému zesílení struktury patrné zejm. při nízkých oscilačních frekvencích, kdy je tedy vzorek podroben velmi slabému mechanickému působení. Za vyšších frekvencí totiž dochází k narušení interakcí, resp. vzorek již není schopen relaxovat při takových frekvencích ( $> 1$  Hz). Výsledky z oscilačních měření jsou poněkud v rozporu s tokovými, kdy se zvyšujícím se přídavkem protiiontů klesá zdánlivá viskozita. Pod kritickou koncentrací polymeru, ve které je nízká četnost kontaktů mezi řetězci se projevuje i vliv valence iontu, která vede k dalšímu snížení viskozity.

Vzorky kyselé formy CMC-H vykazují poněkud větší mechanickou odolnost, než stejně koncentrované vzorky CMC-Na, tedy původní sodné soli. Nicméně výsledky jsou opět patrné zejm. při nízkých frekvencích. Na druhou stranu, tokové testy ukazují opět snížení viskozity oproti původní sodné soli CMC-Na o téže koncentraci.



Ze zjištěných výsledků tedy vyplývá, že pro posílení mechanických vlastností, příp. síťování je třeba uvážit vhodnou koncentraci CMC-Na, dále poměr karboxylových skupin a protiiontů, vliv iontové síly a pH.

Výsledky MD simulací prokázali drobné rozdíly ve struktuře hydratačního obalu hyaluronanu mezi sodnou a vápenatou solí. Nicméně tento simulovaný systém je natolik malý, že není možné kvantifikovat rozdíly mezi jednotlivými kovovými ionty v síle vazby polyelektrolytickému řetězci. V obou případech se ionty zdržovali po celou dobu simulace v těsné blízkosti karboxylátových skupin.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Lowry, K. M., Beavers, E. M.: Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1994, vol. 28, pp. 1239–1244.
- [2] Hercogová, J.: *Implantáty do vrásek, jizev. Zvětšování rtů* [online]. 2003, [cit. 12. 1. 2010].  
Dostupné z: <<http://www.dermatology.cz/implantaty-do-vrasek>>.
- [3] Vandamme, E. J., Bašta, S. De, Steinbüchel, A.: *Biopolymers 5, Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 534 p. ISBN 3-527-30226-3.
- [4] Lapčík, L. Jr., Bohdanecký, M., Lapčík, L., Bakoš, D.: Kyselina hyaluronová – příprava, struktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické listy*, 1991, roč. 85, s. 281–299.
- [5] Miyazaki, T., Yomota, C., Okada, S.: Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 2001, vol. 74, no. 1, pp. 77–85.
- [6] Contipro Group s.r.o.: *Profil holdingu* [online]. 2006, [cit. 14. 12. 2009].  
Dostupné z: <<http://www.contipro-group.cz>>.
- [7] Hascall, V., Laurent, T.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 1997, [cit. 8. 1. 2010].  
Dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>
- [8] Balazs, E. A., Hascall, V. C.: *Hyaluronan: Structure, Metabolism, Biological Activities, Therapeutic Applications: Rheological Stability of Hyaluronan-Based Artificial Tears*. 1<sup>st</sup> ed. New Jersey: Matrix Biology Institute, 2005. 950 p. ISBN 0-9771359-0-X.
- [9] Lapčík, L. Jr., Lapčík, L., Smedt, S. De, Demeester, J., Chabreček, P.: Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, vol. 98, no. 8, pp. 2663–2684.
- [10] Medical Laser Centre: *Aplikace kyseliny hyaluronové* [online]. 2000–2006, [cit. 21. 2. 2010]. Dostupné z: <<http://www.mlc-laser.com/cz/provadene-zakroky/aplikace-kyseliny-hyaluronove.php>>.
- [11] Nováček, F.: *Fytochemické základy botaniky*. 2. vyd. Olomouc: Fontána, 2008. 284 s. ISBN 978-80-7336-457-1.
- [12] Kim, J., Yun, S.: Discovery of Cellulose as a Smart Material. *Macromolecules*, 2006, vol. 39 (12), pp. 4202–4206.
- [13] Lovochemik: *KMC = náš osud* [online]. 2009, [cit. 4. 1. 2010]. Dostupné z: <<http://www.lovochemie.cz/download.php?file=download/pdf/Lovochemik-0903.pdf>>
- [14] Methylcellulose & Sodium Carboxymethylcellulose: *Uses in Paper Conservation* [online]. 1982, [cit. 15. 3. 2010].  
Dostupné z: <<http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v01/bp01-04.html>>
- [15] Yang, X. H., Zhu, W. L.: Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. *Cellulose*, 2007, vol. 14, no. 5, pp. 409–417. ISSN 0969-0239.
- [16] Velišek, J.: *Chemie potravin*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [17] Bruix, A., Adán, A., Casaroli-Marano, R.: Efficacy of sodium carboxymethylcellulose in the treatment of dry eye syndrome. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2006, vol. 81(2), pp. 85–92.
- [18] Käßner, U., Hoffmann, H., Dönges, R., Hilbig, J.: Structure and solution properties of sodium carboxymethylcellulose. *Colloids and Surfaces*, 1997, vol. 123–124, pp. 307–328. ISSN 0927-7757.
- [19] Nokhodchi, A., Tailor, A.: In situ cross-linking of sodium alginate with calcium and aluminium ions to sustain the release of theophylline from polymeric matrices. *Il Farmaco*, 2004, vol. 59, pp. 999–1004. ISSN 0014-827X/\$.
- [20] Bartovská, L., Šišková, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0.

- [21] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-X.
- [22] Michailova, V., Titeva, St., Kotsilkova, R., Krusteva, E., Minkov, E.: Influence of aqueous medium on viscoelastic properties of carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylmethyl cellulose, and thermally pre-gelatinized starch gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, vol. 149, pp. 515–520.
- [23] Goldberg, E. P., Jayakrishnan, A., Yalon, M.: Viscoelastic material for ophthalmic surgery. *United states patent and trademark office*, 1989, patent no. 4, 819, 617.
- [24] Brito, A. C., Silva, D., Paula, R., Feitosa, J.: Sterculia striata exudate polysaccharide: characterization, rheological properties and comparison with Sterculia urens (karaya) polysaccharide. *Polymer International*, 2004, vol. 53, pp. 1025–1032.
- [25] Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K.: *An introduction to rheology*. Elsevier, 1989. 199 p. ISBN 0-444-87140-3.
- [26] Klučáková, M.: *Reologie ve spotřební chemii*. VUT v Brně [online]. 2008 [cit. 4. 2. 2010].
- [27] Kulicke, W.-M., Clasen, C.: *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. 121 p. ISBN 3-540-40760-X.
- [28] Brummer, R.: *Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions*. Berlin: Springer, 2006. 180 p. ISBN 3-540-25553-2.
- [29] Kvítek, L., Panáček, A.: *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 52 s. Dostupný z: <<http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>>.
- [30] Rheology school: *Rheological Testing of Creams, Lotions and Ointments* [online]. [cit. 9. 3. 2009]. Dostupný z: <[www.rheologyschool.com](http://www.rheologyschool.com)>.
- [31] Novák, J. P.: *Fyzikální chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 316 s. ISBN 80-7080-436-X.
- [32] Wyss, H. M., Larsen, R. J., Weitz, D. A.: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. *G.I.T. Laboratory Journal*, 2007, vol. 3–4, pp. 68–70.
- [33] Remko, M.: *Molekulové modelovanie*. 1. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000. 240 s. ISBN 80-88908-62-0.
- [34] Allen, M. P., Tildesley, D. J.: *Computer simulations of liquids*. New York: Clarendon Press, 1989. 385 p. ISBN 0-19-855645-4.
- [35] Holmbeck, S. M. A., Petillo, P. A., Lerner, L. E.: The Solution Conformation of Hyaluronan: A Combined NMR and Molecular Dynamics Study. *Biochemistry*, 1994, vol. 33 (47), pp. 14246–14255.
- [36] Kaufmann, J., Möhle, K., Hofmann, H. J., Arnold, K.: Molecular Dynamics of a Tetrasaccharide Subunit of Chondroitin 4-sulfate in Water. *Carbohydrate Research*, 1999, vol. 318 (1–4), pp. 1–9.
- [37] Kaufmann, J., Wiegel, D., Arnold, K.: Polar Interactions of Hyaluronic Acid – Experiments and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1998, vol. 19, pp. 979–1001.
- [38] Kaufmann, J., Möhle, K., Hofmann, H. J., Arnold, K.: Molecular Dynamics Study of Hyaluronic Acid in Water. *Journal of Molecular Structure*, 1998, vol. 422, pp. 109–121.
- [39] Almond, A., Sheehan, J. K., Brass, A.: Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology*, 1997, vol. 7 (5), pp. 597–604.
- [40] Almond, A., Brass, A., Sheehan, J. K.: Dynamic Exchange Between Stabilized Conformations Predicted for Hyaluronan Tetrasaccharides: Comparison of Molecular Dynamics Simulations with Available NMR Data. *Glycobiology*, 1998, vol. 8 (10), pp. 973–980.

- [41] Almond, A., Brass, A., Sheehan, J. K.: Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water – Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, vol. 104 (23), pp. 5634–5640.
- [42] Almond, A., DeAngelis, P. L., Blundell, C. D.: Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix. *Journal of Molecular Biology*, 2006, vol. 358 (5), pp. 1256–1269.
- [43] Almond, A., Brass, A., Sheehan, J. K.: Deducing polymeric structure from aqueous molecular dynamics simulations of oligosaccharides: Predictions from simulations of hyaluronan tetrasaccharides compared with hydrodynamics and X-ray fibre diffraction data. *Journal of Molecular Biology*, 1998, vol. 284 (5), pp. 1425–1437.
- [44] Cavalieri, F., Chiessi, E., Paci, M., Paradossi, G., Flaibani, A., Cesaro, A.: Conformational Dynamics of Hyaluronan in Solution. 1. A  $^{13}\text{C}$  NMR Study of Oligomers. *Macromolecules*, 2001, vol. 34 (1), pp. 99–109.
- [45] Letardi, S., La Penna, G., Chiessi, E., Perico, A., Cesaro, A.: Conformational Dynamics of Hyaluronan in Solution. 2. Mode-Coupling Diffusion Approach to Oligomers. *Macromolecules*, 2002, vol. 35 (1), pp. 286–300.
- [46] Furlan, S., La Penna, G., Perico, A., Cesaro, A.: Conformational Dynamics of Hyaluronan Oligomers in Solution. 3. Molecular Dynamics from Monte Carlo Replica-Exchange Simulations and Mode-Coupling Diffusion Theory. *Macromolecules*, 2004, vol. 37 (16), pp. 6197–6209.
- [47] Furlan, S., La Penna, G., Perico, A., Cesaro, A.: Hyaluronan Chain Conformation and Dynamics. *Carbohydrate Research*, 2005, vol. 340 (5), 959–970.
- [48] Bathe, M., Rutledge, G. C., Grodzinsky, A. J., Tidor, B.: Osmotic Pressure of Aqueous Chondroitin Sulfate Solution: A Molecular Modeling Investigation. *Biophysical Journal*, 2005, vol. 89 (4), pp. 2357–2371.
- [49] Bathe, M., Rutledge, G. C., Grodzinsky, A. J., Tidor, B.: A Coarse-Grained Molecular Model for Glycosaminoglycans: Application to Chondroitin, Chondroitin Sulfate, and Hyaluronic Acid. *Biophysical Journal*, 2005, vol. 88 (6), pp. 3870–3887.
- [50] Hargittai, I., Hargittai, M.: Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*, 2008, vol. 19 (5), pp. 697–717.
- [51] Hendl, J.: *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha: Portál, 2004. 583 s. ISBN 80-7178-820-1.
- [52] Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., Tirado-Rives, J.: Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, vol. 118 (45), pp. 11225–11236.
- [53] Maxwell, D. S., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W. L.: A Comprehensive Study of the Rotational Energy Profiles of Organic Systems by Ab Initio MO Theory, Forming a Basis for Peptide Torsional Parameters. *Journal of Computational Chemistry*, 1995, vol. 16, pp. 984–1010.
- [54] Jorgensen, W. L., McDonald, N. A.: Development of an All-Atom Force Field for Heterocycles. Properties of Liquid Pyridine and Diazenes. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 1998, vol. 424, pp. 145–155.
- [55] McDonald, N. A., Jorgensen, W. L.: Development of an All-Atom Force Field for Heterocycles. Properties of Liquid Pyrrole, Furan, Diazoles, and Oxazoles. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, vol. 102, pp. 8049–8059.
- [56] Rizzo, R. C., Jorgensen, W. L.: OPLS All-Atom Model for Amines: Resolution of the Amine Hydration Problem. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, vol. 121, pp. 4827–4836.

- [57] Price, M. L. P., Ostrovsky, D., Jorgensen, W. L.: Gas-Phase and Liquid-State Properties of Esters, Nitriles, and Nitro Compounds with the OPLS-AA Force Field. *Journal of Computational chemistry*, 2001, vol. 22, pp. 1340–1352.
- [58] Ma, L., Barbosa-Cánovas, G. V.: Viscoelastic Properties of Xanthan Gels Interacting with Cations. *Journal of Food Science*, 1997, vol. 62, no. 6, pp. 1124–1128.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC-Na	karboxymethylcelulóza sodná
CMC-H	protonizovaná karboxymethylcelulóza
HA	kyselina hyaluronová
HA-Na	hyaluronan sodný
HA-Ca	hyaluronan vápenatý
GlcA	glukuronová kyselina
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
NaCl	chlorid sodný
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
HCl	kyselina chlorovodíková
LVE	lineární viskoelastická oblast
DS	stupeň substituce (degree of substitution)
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
PVC	polyvinylchlorid
MD	molekulová dynamika
$I$	iontová síla
L-J	Lennard-Jones
rdf	radiální distribuční funkce $g(r)$
hm.	hmotnostní
$c$	koncentrace
$z$	náboj iontu
$A$	plocha
$F$	síla
$h$	vzdálenost dvou paralelních desek
$M$	kroutivý moment
$R$	poloměr
$w$	hmotnostní koncentrace
$\alpha$	úhel kužele
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
$\eta$	zdánlivá viskozita
$\eta_i$	inkrement relativní viskozity
$\eta_{inh}$	inherentní viskozita
$\eta_p$	viskozita polymeru
$\eta_{rel}$	relativní viskozita
$\eta_{red}$	redukováná viskozita
$\eta_0$	viskozita disperzního prostředí (rozpouštědla)
$[\eta]$	vnitřní viskozita
$\nu$	kinematická viskozita
$\pi$	Ludolfovo číslo ( $\sim 3,14$ )
$\rho$	hustota kapaliny
$\sigma$	smykové napětí
$\sigma_0$	mez toku
$\omega$	úhlová rychlost
$\varphi$	fluidita
$K$	koeficient kontistence
$n$	index toku
$G'$	paměťový modul

$G''$	ztrátový modul
$G^*$	komplexní modul
$\delta$	ztrátový úhel
$\varepsilon$	hloubka energetického minima
$\sigma$	průměr atomů
$q_i, q_j$	parciální náboje příslušných atomů
$\varepsilon_r$	relativní permitivita
$\varepsilon_0$	permitivita vakua
$r$	vzdálenost mezi atomy